



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO INDICATIVO DE ESTABILIDADE PARA
DETECÇÃO DE PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO DE
ZIDOVUDINA E LAMIVUDINA (300 + 150 mg) EM MATÉRIA-PRIMA E
COMPRIMIDOS**

JOSÉ IZAK RIBEIRO DE ARAÚJO

JOÃO PESSOA

2014

JOSÉ IZAK RIBEIRO DE ARAÚJO

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO INDICATIVO DE ESTABILIDADE PARA
DETECÇÃO DE PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO DE
ZIDOVUDINA E LAMIVUDINA (300 + 150 mg) EM MATÉRIA-PRIMA E
COMPRIMIDOS**

Trabalho de conclusão de curso para obtenção do título
de graduação em Farmácia apresentado à Universidade
Federal da Paraíba – UFPB.

Orientadora: Prof^a. Msc. Silvana Teresa Lacerda Jales

JOÃO PESSOA

2014

A663d Araújo, José Izak Ribeiro de.

Desenvolvimento de método indicativo de estabilidade para detecção de produtos de degradação da associação de zidovudina e lamivudina (300 + 150 mg) em matéria-prima e comprimidos / José Izak Ribeiro de Araújo. -- João Pessoa: [s.n.], 2014.

109f.; il. --

Orientadora: Silvana Teresa Lacerda Jales.

Monografia (graduação) -- UFPB/CCS.

1. Método indicativo de estabilidade. 2. Testes de estresse. 3. Produtos de degradação. 4. Zidovudina lamivudina.

BS/CCS/UFPB

CDU: 615.077

JOSÉ IZAK RIBEIRO DE ARAÚJO

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO INDICATIVO DE ESTABILIDADE PARA
DETECÇÃO DE PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO DE
ZIDOVUDINA E LAMIVUDINA (300 + 150 mg) EM MATÉRIA-PRIMA E
COMPRIMIDOS**

Trabalho de conclusão de curso para obtenção do título
de graduação em Farmácia apresentado à Universidade
Federal da Paraíba – UFPB.

Aprovado em: ____ de ____ de 2014

BANCA EXAMINADORA:

Prof^a. Msc. Silvana Teresa Lacerda Jales
(Orientadora)

Prof^a. Msc. Fabíola Bernardo Carneiro
(Membro)

Prof. Dr. Pablo Queiroz Lopes
(Membro)

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter concebido o alcance dos meus objetivos e guiado a tomada de todas as decisões.

À minha família, por acreditar e apoiar as minhas escolhas, esforçando-se junto a mim para que as dificuldades fossem supridas.

À professora Silvana Jales, pelo estímulo a realização do estágio em indústria no LAFEPE e pela dedicação em suas orientações.

Ao Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco Governador Miguel Arraes (LAFEPE) pela oportunidade de desenvolver este trabalho. Em especial aos que fazem parte da Coordenadoria de Pesquisa e Desenvolvimento (COP&D) e que foram responsáveis pela condução deste trabalho: Dra. Aíla Karla Mota Santana e Msc. Bruno Aires dos Santos.

Ao povo brasileiro e a Universidade Federal da Paraíba que proporcionaram a minha formação acadêmica. Em especial, a funcionária da Biblioteca Central, Regina Carneiro, exemplo de humanidade.

Aos professores Sócrates Golzio e Zélia Braz que proporcionaram a minha participação em projetos de iniciação científica e extensão, respectivamente.

Às minhas amigas: Amanda Damasceno, Fernanda Subrinho, Karlienne Hozana, Alice Bezerra, Roseana Ramos e Luciana Lígia que foram companheiras de todas as horas e a quem sou muito grato pela amizade.

RESUMO

A estabilidade pode ser elucidada como o período ao qual uma especialidade farmacêutica ou mesmo a matéria-prima isolada, permanece de acordo com os limites especificados ao longo do período de estocagem e uso, com as mesmas condições e características que possuía na data de sua fabricação. Com a finalidade de avaliar a estabilidade são realizados testes de degradação forçados em que o produto é submetido a estudos que fornecem evidências de como a qualidade pode sofrer variações no decorrer do tempo. O método indicativo de estabilidade deve medir com precisão as mudanças na concentração de insumos ativos, sem interferência de outros produtos de degradação, impurezas e excipientes. A finalidade do trabalho foi desenvolver um método indicativo de estabilidade, baseada na metodologia da The United States Pharmacopeia (USP 36) para substâncias relacionadas de comprimidos de zidovudina e lamivudina associadas, através de testes de estresse em meio alcalino, ácido, neutro e oxidativo. Os resultados foram analisados a partir da interpretação dos cromatogramas gerados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) com detector de arranjo de diodos (DAD). A zidovudina mostrou-se estável nas condições ácida e básica menos concentradas (0,1 e 1,0 M) na forma de matéria-prima e comprimido, bem como na hidrólise neutra e na degradação oxidativa em comprimido. Porém mostrou-se instável nas condições mais severas das hidrólises ácida e básica (5,0 M), assim como na degradação oxidativa na forma de matéria-prima. A lamivudina sob a forma de matéria-prima mostrou-se estável apenas nas condições de hidrólise ácida mais branda (0,1 e 1,0 M) e instável em meio alcalino (0,1, 1,0 e 5,0 M) e em todas as concentrações na degradação oxidativa, em relação ao seu comportamento sob a forma de comprimido, permaneceu estável nas condições ácidas brandas (0,1 e 1,0 M), assim como em meio alcalino (0,1 M) e na hidrólise neutra e instável em meios alcalinos (1,0 e 5,0 M), hidrólise ácida (5,0 M) e em todas as concentrações da degradação oxidativa. Os tempos de estudo variaram em cada condição, conforme o grau de produzir degradação de cada solução degradativa frente aos ativos, uma vez que a legislação preconiza uma extensão de degradação dos ativos entre 10 e 30%. Conforme os resultados obtidos verificou-se que o método indicativo de estabilidade (MIE) consegue detectar produtos de degradação advindos dos ativos que venham à surgir após os testes de estresse.

Palavras-chave: Método indicativo de estabilidade, testes de estresse, produtos de degradação, zidovudina, lamivudina.

ABSTRACT

Stability can be elucidated as the period to which a proprietary product or raw material alone, remains in accordance with the limits specified over the period of storage and use, with the same conditions and characteristics that had the date of its manufacture . In order to evaluate the stability of forced degradation test in which the product is subjected to studies provide evidence on how the quality can be varied over time are performed. The method indicative of stability must accurately measure changes in the concentration of active ingredients, without interference from other degradation products, impurities and excipients. The purpose of this study was to develop a stability indicating method, based on the methodology of The United States Pharmacopeia (USP 36) for related substances tablet zidovudine and lamivudine associated through stress tests in alkaline, acidic, neutral and oxidative. The results were analyzed based on the interpretation of the chromatograms generated by High Efficiency Liquid Chromatography (HPLC) with diode array detector (DAD). Zidovudine was stable in the less concentrated (0.1 to 1.0 M) as raw materials and compressed acidic and basic conditions and in the neutral hydrolysis and oxidative degradation tablet. However proved to be unstable in the severest conditions of acidic and basic hydrolysis (5.0 M), as well as oxidative degradation as raw material. Lamivudine in the form of raw material was stable only in milder conditions (0.1 and 1.0M) and unstable acid hydrolysis in an alkaline medium (0.1, 1.0 and 5.0 M) and at all concentrations in the oxidative degradation compared to their behavior in the form of tablets, remained stable under mild acidic conditions (0.1 and 1.0) and in alkaline medium (0.1 M) and hydrolysis stable in neutral and alkaline media (1.0 to 5.0 M) acid hydrolysis (5.0 M) and at all concentrations of oxidative degradation. The time of study varied at each condition according to the degree of degradation of each solution producing degradative against assets, since the law calls an extension of degradation of assets between 10 and 30%. According to the results it was found that the method indicative of stability (MIE) can detect degradation products arising from assets that may arise after the stress tests.

Keywords: method indicative of stability, stress testing, degradation products, zidovudine, lamivudine.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Estrutura do Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV)	18
Figura 2: Ciclo de replicação do HIV	20
Figura 3: Estrutura química da Lamivudina (3TC) e Zidovudina (AZT)	26
Figura 4: Overlay dos cromatogramas na condição de hidrólise alcalina 0,1 M nos tempos zero (verde) e 30 dias (azul)	45
Figura 5: Overlay dos cromatogramas na condição de hidrólise alcalina 1,0 M nos tempos zero (verde), 72 horas (marrom) e 30 dias (azul)	48
Figura 6: Overlay dos cromatogramas na condição de hidrólise alcalina 5,0 M nos tempos zero (verde) e 24 horas (preto)	52
Figura 7: <i>Overlay</i> dos cromatogramas na condição de hidrólise ácida 0,1M nos tempos zero (verde) e 30 dias (azul)	56
Figura 8: Overlay dos cromatogramas na condição de hidrólise ácida 1,0 M nos tempos zero (verde) e 30 dias (azul).	58
Figura 9: Overlay dos cromatogramas na condição de hidrólise ácida 5,0 M nos tempos zero (verde) e 7 dias (preto)	61
Figura 10: Overlay dos cromatogramas na condição de degradação por oxidação (H_2O_2 0,03%) nos tempos zero (preto) e 7 dias (verde)	65
Figura 11: Overlay dos cromatogramas na condição de degradação por oxidação (H_2O_2 0,3%) nos tempos zero (preto) e 7 dias (verde)	68
Figura 12: Overlay dos cromatogramas na condição de degradação por (H_2O_2 3%) oxidação nos tempos zero (preto) e 7 dias (verde)	71
Figura 13: Overlay dos cromatogramas na condição de degradação por hidrólise ácida 0,1M nos tempos zero (verde) e 30 dias (preto)	73
Figura 14: Overlay dos cromatogramas na condição de degradação por hidrólise ácida 1,0 M nos tempos zero (verde) e 30 dias preto	76
Figura 15: Overlay dos cromatogramas na condição de degradação por hidrólise ácida 5,0 M nos tempos zero (verde) e 15 dias (preto)	80
Figura 16: Overlay dos cromatogramas na condição de hidrólise básica 0,1M nos tempos zero (verde) e 30 dias (preto)	84
Figura 17: Overlay dos cromatogramas na condição de hidrólise básica 1,0 M nos tempos zero (verde) e 30 dias (preto)	87

Figura 18: Overlay dos cromatogramas na condição de degradação por hidrólise básica 5,0 M nos tempos zero (verde) e 24 horas (preto)	90
Figura 19: Overlay dos cromatogramas na condição de degradação por oxidação (H_2O_2 0,03%) nos tempos zero (verde) e 30 dias (preto)	94
Figura 20: Overlay dos cromatogramas na condição de degradação por oxidação (H_2O_2 0,3%) nos tempos zero (azul), 24 horas (preto) e o branco das amostras (verde)	96
Figura 21: Overlay dos cromatogramas na condição de degradação por oxidação (H_2O_2 3%) nos tempos zero (verde), 24 horas (preto) e o branco das amostras (azul)	100
Figura 22: Overlay dos cromatogramas na condição de degradação neutra nos tempos zero (verde) e 30 dias (preto)	102
Gráfico 1: Taxa de detecção de AIDS por Unidade da Federação, 2013.	21
Gráfico 2: Taxa de mortalidade por AIDS segundo região de residência e ano do óbito. Brasil, 2003 a 2012.	22
Gráfico 3: Distribuição percentual de casos de AIDS por região de residência. Brasil, 1980 a 2013.	23
Gráfico 4: Gráficos de pureza e similaridade de picos de lamivudina e zidovudina no estudo de degradação alcalina 0,1 M no tempo de 30 dias (matéria-prima). Para a similaridade o padrão é representado em verde e a amostra em azul	45
Gráfico 5: Gráficos de pureza e similaridade de picos de lamivudina e zidovudina no estudo de degradação alcalina 1,0 M no tempo de 30 dias (matéria-prima). Para a similaridade o padrão é representado em verde e a amostra em azul.	48
Gráfico 6: Gráficos de pureza e similaridade de picos de lamivudina e zidovudina no estudo de degradação alcalina 5,0 M no tempo de 24 horas (matéria-prima). Para a similaridade o padrão é representado em verde e a amostra em azul	52
Gráfico 7: Gráficos de pureza e similaridade de picos de lamivudina e zidovudina no estudo de degradação ácida 0,1 M no tempo de 30 dias (matéria-prima). Para a similaridade o padrão é representado em verde e a amostra em azul.	56
Gráfico 8: Gráficos de pureza e similaridade de picos de lamivudina e zidovudina no estudo de degradação ácida 1,0 M no tempo de 30 dias (matéria-prima). Para a similaridade o padrão é representado em verde e a amostra em azul.	59

Gráfico 9: Gráficos de pureza e similaridade de picos de lamivudina e zidovudina no estudo de degradação ácida 5,0 M no tempo de 7 dias (matéria-prima). Para a similaridade o padrão é representado em verde e a amostra em azul.	62
Gráfico 10: Gráficos de pureza e similaridade de picos de lamivudina e zidovudina no estudo de degradação oxidativa (H_2O_2 0,03%) no tempo de 7 dias (matéria-prima). Para a similaridade o padrão é representado em verde e a amostra em azul.	65
Gráfico 11: Gráficos de pureza e similaridade de picos de lamivudina e zidovudina no estudo de degradação oxidativa (H_2O_2 0,3%) no tempo de 7 dias (matéria-prima). Para a similaridade o padrão é representado em verde e a amostra em azul.	68
Gráfico 12: Gráficos de pureza e similaridade de picos de lamivudina e zidovudina no estudo de degradação oxidativa (H_2O_2 3%) no tempo de 7 dias (matéria-prima). Para a similaridade o padrão é representado em verde e a amostra em azul.	71
Gráfico 13: Gráficos de pureza e similaridade de picos de lamivudina e zidovudina no estudo de hidrólise ácida HCL 0,1 M no tempo de 30 dias (comprimido). Para a similaridade o padrão é representado em verde e a amostra em azul.	74
Gráfico 14: Gráficos de pureza e similaridade de picos de lamivudina e zidovudina no estudo de hidrólise ácida 1,0 M no tempo de 30 dias (comprimido). Para a similaridade o padrão é representado em verde e a amostra em azul.	77
Gráfico 15: Gráficos de pureza e similaridade de picos de lamivudina e zidovudina no estudo de hidrólise ácida 5,0 M no tempo de 15 dias (comprimido). Para a similaridade o padrão é representado em verde e a amostra em azul.	80
Gráfico 16: Gráficos de pureza e similaridade de picos de lamivudina e zidovudina no estudo de hidrólise básica 0,1 M no tempo de 30 dias (comprimido). Para a similaridade o padrão é representado em verde e a amostra em azul.	84
Gráfico 17: Gráficos de pureza e similaridade de picos de lamivudina e zidovudina no estudo de hidrólise básica 1,0 M no tempo de 30 dias (comprimido). Para a similaridade o padrão é representado em verde e a amostra em azul.	87
Gráfico 18: Gráficos de pureza e similaridade de picos de lamivudina e zidovudina no estudo de degradação básica 5,0 M no tempo de 24 horas (comprimido). Para a similaridade o padrão é representado em verde e a amostra em azul.	91
Gráfico 19: Gráficos de pureza e similaridade de picos de lamivudina e zidovudina no estudo de degradação oxidativa (H_2O_2 0,03%) no tempo de 30 dias (comprimido). Para a similaridade o padrão é representado em verde e a amostra em azul.	94

Gráfico 20: Gráficos de pureza e similaridade de picos de lamivudina e zidovudina no estudo de degradação oxidativa (H_2O_2 0,3%) no tempo de 24 horas (comprimido). Para a similaridade o padrão é representado em verde e a amostra em azul.	97
Gráfico 21: Gráficos de pureza e similaridade de picos de lamivudina e zidovudina no estudo de degradação oxidativa (H_2O_2 3%) no tempo de 24 horas (comprimido). Para a similaridade o padrão é representado em verde e a amostra em azul.	100
Gráfico 22: Gráficos de pureza e similaridade de picos de lamivudina e zidovudina no estudo de degradação neutra (H_2O) no tempo de 30 dias (comprimido). Para a similaridade o padrão é representado em verde e a amostra em azul.	103

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Limites de notificação e qualificação do(s) produto(s) de degradação no decorrer do estudo de estabilidade (BRASIL, 2013).	31
Tabela 2: Padrões primários, secundários e ativos utilizados	36
Tabela 3: Reagentes utilizados nas análises	37
Tabela 4: Concentração de cada solução (A, B e C) na fase móvel por tempo de corrida.	38
Tabela 5: Áreas e tempos de retenção relativa (TRR) dos picos e teores de lamivudina e zidovudina presentes nas amostras de hidrólise alcalina 0,1 M (matéria-prima) por tempo de estudo	46
Tabela 6: Áreas e Tempo de Retenção Relativa (TRR) dos picos e teor de lamivudina e zidovudina presentes nas amostras de hidrólise alcalina 1,0 M (matéria-prima) por tempo de estudo	49
Tabela 7: Áreas e tempo de retenção relativa (TRR) dos picos de origem desconhecida nas amostras de hidrólise alcalina 1,0 M (matéria-prima) por tempo de estudo	50
Tabela 8: Áreas e tempo de retenção relativa (TRR) dos picos de origem desconhecida nas amostras de hidrólise alcalina 5,0 M (matéria-prima) por tempo de estudo	53
Tabela 9: Áreas e Tempos de retenção relativa (TRR) dos picos e teor de lamivudina e zidovudina presentes nas amostras de hidrólise alcalina 5,0 M (matéria-prima) por tempo de estudo	54
Tabela 10: Áreas e Tempo de Retenção Relativa (TRR) dos picos e teor de lamivudina e zidovudina presentes nas amostras de hidrólise ácida 0,1 M (matéria-prima) por tempo de estudo	57

Tabela 11: Áreas e tempo de retenção relativa (TRR) dos picos de origem desconhecida nas amostras de hidrólise ácida 1,0 M (matéria-prima) por tempo de estudo	59
Tabela 12: Áreas e Tempo de Retenção Relativa (TRR) dos picos e teor de lamivudina e zidovudina presentes nas amostras de hidrólise ácida 1,0 M (matéria-prima) por tempo de estudo	60
Tabela 14: Áreas e tempo de retenção relativa (TRR) dos picos de origem desconhecida nas amostras de hidrólise ácida 5,0 M (matéria-prima) por tempo de estudo	63
Tabela 13: Áreas e Tempo de Retenção Relativa (TRR) dos picos e teor de lamivudina e zidovudina presentes nas amostras de hidrólise ácida 5,0 M (matéria-prima) por tempo de estudo	63
Tabela 15: Áreas e Tempo de Retenção Relativa (TRR) dos picos e teor de lamivudina e zidovudina presentes nas amostras que sofreram oxidação (H_2O_2 0,03%) por tempo de estudo	66
Tabela 16: Áreas e Tempo de Retenção Relativa (TRR) dos picos e teor da lamivudina e zidovudina presentes nas amostras que sofrem oxidação (H_2O_2 0,3%) matéria-prima por tempo de estudo	69
Tabela 17: Áreas e Tempo de Retenção Relativa (TRR) dos picos e teor de lamivudina e zidovudina presentes nas amostras que sofrem oxidação (H_2O_2 3%) matéria-prima por tempo de estudo	72
Tabela 18: Áreas e Tempo de Retenção Relativa (TRR) dos picos e teor de lamivudina e zidovudina presentes nas amostras que sofreram hidrólise ácida 0,1 M (comprimido) por tempo de estudo	75
Tabela 19: Áreas e Tempo de Retenção Relativa (TRR) dos picos e teor de lamivudina e zidovudina presentes nas amostras que sofreram hidrólise ácida 1,0 M (comprimido) por tempo de estudo	78
Tabela 20: Áreas e Tempo de Retenção Relativa (TRR) dos picos e teor de lamivudina e zidovudina presentes nas amostras que sofreram hidrólise ácida 5,0 M (comprimido) por tempo de estudo	81
Tabela 21: Áreas e Tempo de Retenção Relativa (TRR) dos picos e teor de lamivudina e zidovudina presentes nas amostras que sofreram hidrólise ácida 5,0 M (comprimido) por tempo de estudo	82
Tabela 22: Áreas e Tempo de Retenção Relativa (TRR) dos picos e teor de lamivudina e zidovudina nas amostras que sofreram hidrólise básica 0,1 M (comprimido) por tempo de estudo	85

Tabela 23: Áreas e Tempo de Retenção Relativa (TRR) dos picos de origem desconhecida nas amostras de hidrólise básica 1,0 M (comprimido) por tempo de estudo	88
Tabela 24: Áreas e Tempo de Retenção Relativa (TRR) dos picos e teor de lamivudina e zidovudina presentes nas amostras que sofreram hidrólise básica 1,0 M (comprimido) por tempo de estudo	89
Tabela 25: Áreas e Tempo de Retenção Relativa (TRR) dos picos e teor de lamivudina e zidovudina nas amostras que sofreram hidrólise básica 5,0 M (comprimido) por tempo de estudo	92
Tabela 26: Áreas e Tempo de Retenção Relativa (TRR) dos picos e teor de lamivudina e zidovudina presentes nas amostras que sofreram oxidação (H_2O_2 0,03%), comprimido por tempo de estudo	95
Tabela 27: Áreas e Tempo de Retenção Relativo (TRR) dos picos e teor de lamivudina e zidovudina presentes nas amostras que sofreram oxidação (H_2O_2 0,3%) comprimido, por tempo de estudo	98
Tabela 28: Áreas e Tempo de Retenção Relativa (TRR) dos picos e teor de lamivudina e zidovudina presentes nas amostras que sofreram oxidação (H_2O_2 3%) comprimido por tempo de estudo	101
Tabela 29: Áreas e Tempo de retenção relativa (TRR) dos picos e teor de lamivudina e zidovudina presentes nas amostras que sofreram hidrólise neutra (comprimido) por tempo de estudo	104

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. OBJETIVOS	16
2.1 OBJETIVO GERAL	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3. REFERENCIAL TEÓRICO	17
3.1 Vírus da imunodeficiência humana (HIV).....	17
3.2 Síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS): Epidemiologia e Políticas Públicas de Saúde.....	21
3.3 Terapia antirretroviral	24
3.4 Propriedades de Lamivudina (3TC) e Zidovudina (AZT)	25
3.5 Produção de Antirretrovirais no Brasil	27
3.6 Estudos de estabilidade	28
3.6.1 Testes de degradação forçada	29
3.6.2 Métodos Indicativos de Estabilidade – MIE	31
3.6.3 Fatores que influenciam a estabilidade de fármacos e medicamentos.....	33
3.6.3.1 Hidrólise.....	33
3.6.3.2 Oxidação	34
3.6.3.3 Temperatura	34
3.6.3.4 Fotólise.....	34
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	36
4.1 MATERIAIS	36
4.1 REAGENTES	36
4.1.2 EQUIPAMENTOS	37
4.2 MÉTODOS	37
4.2.1 Método USP36 de Substâncias Relacionadas de zidovudina/lamivudina comprimido (USP, 2013).....	37
4.2.1.1 Sistema cromatográfico	38
4.2.1.2 Fase móvel	38
4.2.1.3 Sistema Gradiente de concentração	38
4.3 Ensaios do teste de degradação forçada.....	39
4.3.1 Preparo das Amostras	40

4.3.1.2 Comprimidos	40
4.3.1.3 Matéria-Prima (MIX).....	40
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
5.1 Matéria-Prima (MIX).....	43
5.1.1 Hidrólise alcalina	43
5.1.2 Hidrólise ácida	55
5.1.3 Oxidação	64
5.2 Comprimidos	73
5.2.1 Hidrólise ácida	73
5.2.2 Hidrólise alcalina	83
5.2.3 Oxidação	93
6. CONCLUSÃO	105
REFERÊNCIAS	106

1. INTRODUÇÃO

A estabilidade pode ser definida como o tempo decorrente ao qual uma especialidade farmacêutica ou mesmo a matéria prima isolada, mantém dentro dos limites especificados durante todo o período de estocagem e uso, as mesmas condições e características que possuía quando da época de sua fabricação (SILVA et al., 2009).

Os estudos de estabilidade são realizados com a aplicabilidade de prever, determinar ou acompanhar o prazo de validade e o período de utilização dos produtos farmacêuticos, conforme embalagem e condições de armazenamento especificadas para garantir a integridade química, física, microbiológica, terapêutica e toxicológica do fármaco e da forma farmacêutica dentro dos limites especificados. (BRASIL, 2005; ANSEL et al., 2007).

Segundo a Resolução nº1/ 2005 da ANVISA, todo relatório de estudo de estabilidade, independente da forma farmacêutica, deve apresentar a quantificação dos produtos de degradação e o método analítico correspondente.

Os produtos de degradação são impurezas resultantes de alterações químicas que surgem no processo de fabricação do fármaco ou medicamento, durante o seu armazenamento, devidos aos efeitos da luz, temperatura, pH, umidade, reações com os excipientes ou devido ao contato com a embalagem primária.

Com a finalidade de regulamentar a notificação, identificação e qualificação de produtos de degradação; a ANVISA por intermédio da RDC nº 58, de 20 de dezembro de 2013, estabeleceu em seu artigo 13, que os parâmetros para a realização dos estudos de estabilidade se aplicam aos registros de medicamentos ou inclusão de nova concentração ou nova forma farmacêutica bem como à renovação de registro e às alterações pós-registro do medicamento.

A complexidade da terapêutica antirretroviral, devido à variedade dos regimes de dosagem, associados à toxicidade, muitas vezes contribuem para erros ou não aderência ao tratamento pelos pacientes, o que pode ser minimizado pelo uso de um medicamento contendo a associação de zidovudina e lamivudina.

Em virtude de possibilitar uma melhoria significativa no tratamento desses pacientes o Ministério da Saúde, estimulou os laboratórios oficiais a produzir o medicamento zidovudina

+ lamivudina 450mg em dose fixa combinada (DFC), uma vez que o esquema de tratamento inicial recomendado no Brasil é a dupla de inibidores nucleosídeos da transcriptase reversa (INTR) zidovudina (AZT) e lamivudina (3TC) associado a um inibidor não-nucleosídeo da transcriptase reversa (INNTR).

O LAFEPE, assim como as indústrias farmacêuticas nacionais, precisa se adequar as regulamentações exigidas pela ANVISA, com esta finalidade a Coordenação de Pesquisa e Desenvolvimento (COP&D) tem aplicado estudos no desenvolvimento de métodos indicativos de estabilidade, para detecção de possíveis produtos de degradação de fármacos e medicamentos, para que este parâmetro venha a compor um dos requisitos que asseguram aos usuários: a qualidade, segurança e eficácia de seus produtos, uma vez que a formação dos produtos de degradação pode gerar perda de atividade terapêutica ou toxicidade.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver um método indicativo de estabilidade, que seja capaz de detectar produtos de degradação advindos da matéria-prima e do comprimido da associação de zidovudina e lamivudina.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Submeter os fármacos à estudos de degradação forçada;
- Utilizar como parâmetro a monografia USP 36 de Substâncias Relacionadas da Zidovudina/Lamivudina;
- Utilizar a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) acoplada com o detector de arranjo de diodos (DAD) no desenvolvimento do método;
- Permitir a rápida detecção da deterioração na formulação combinada entre zidovudina e lamivudina;
- Predição do prazo em que um produto permanecerá válido para uso, quando armazenado sob condições esperadas ou especificadas de armazenamento;
- Fornecer um modo rápido de controle de qualidade, o qual assegura que nenhuma alteração inesperada ocorrerá no produto armazenado;
- Orientar para possíveis alterações farmacotécnicas do produto.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Vírus da imunodeficiência humana (HIV)

O vírus da Imunodeficiência humana (HIV) é um membro do gênero *Lentivirus* e parte da família *Retroviridae*. Os *Lentivirus* são transmitidos como vírus RNA encapsulados, de sentido positivo e de cadeia única. Ao entrar na célula-alvo, o genoma RNA viral é convertido em DNA de cadeia dupla pela transcriptase reversa, que é transportada juntamente com o genoma viral na partícula do vírus. O DNA viral resultante é então importado para o núcleo celular e integrado no DNA celular pela integrase e cofatores. Uma vez integrado, o vírus pode tornar-se latente, permitindo-lhe a si e à célula hospedeira não serem detectados pelo sistema imunitário. Em alternativa, o vírus pode ser transcrito, produzindo novos genomas RNA e proteínas virais que são libertadas das células como novas partículas virais que iniciam novamente o ciclo de reprodução (ICTV, 2002; SMITH; DANIEL, 2006).

Foram identificados dois tipos de HIV: o HIV-1 e o HIV-2. O HIV-1 é o vírus que foi inicialmente descoberto. É o mais virulento e o que provoca a maioria das infecções por HIV a nível mundial. Devido à sua reduzida capacidade de contágio, o VIH-2 está majoritariamente restrito à África Ocidental (REEVES; DORNS, 2002; GILBERT, 2003).

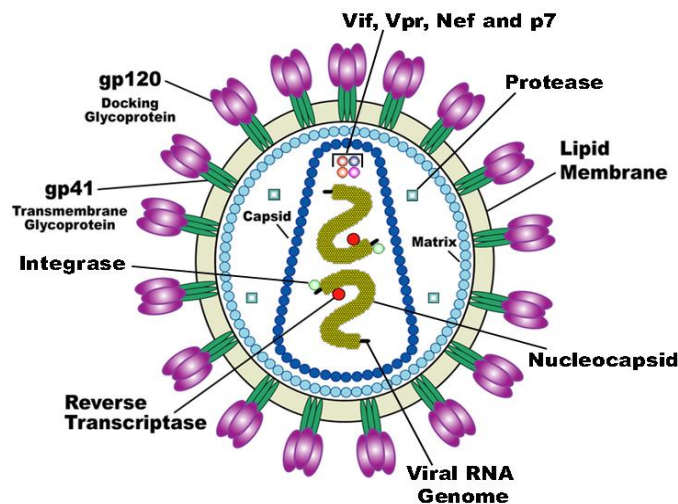
A estrutura do HIV é aproximadamente esférica composta por duas cópias de RNA positivo de cadeia única que codifica os nove genes do vírus, envolto por um capsídeo cônico composto de 2000 cópias da proteína viral p24. O RNA de cadeia único está intimamente ligado às proteínas do nucleocapsídeo, p7, e às enzimas necessárias ao desenvolvimento do virião como a transcriptase reversa, a aspartase, a protease, a ribonuclease e a integrase. O capsídeo é envolto por uma matriz composta pela proteína viral p17, assegurando a integridade da partícula do virião (KUIKEN *et al.*, 2008).

Este conjunto é por sua vez envolto pelo envelope viral, que é composto por duas camadas de moléculas denominadas fosfolipídios, obtidas a partir da membrana de uma célula humana quando uma partícula viral recém-formada brota da célula. No envelope viral estão incorporadas proteínas da célula anfitriã e cerca de 70 cópias de uma proteína complexa do HIV que é proeminente na superfície da partícula viral. Esta proteína, conhecida por Env, consiste num conjunto de três moléculas denominadas glicoproteína 120 (gp120), e uma haste que consiste em três moléculas gp 41 que ligam a estrutura ao envelope viral. Este complexo

glicoproteico permite ao vírus ligar-se e fundir-se com as células-alvo de modo a dar início ao ciclo de infecção. Estas duas proteínas de superfície, sobretudo a gp120, têm vindo a ser identificadas como o alvo de futuros tratamentos ou vacinas contra o HIV.(CHAN *et al.*, 1997; NIH, 1998; KUIKEN *et al.*, 2008).

O genoma de RNA consiste em pelo menos sete marcos estruturais (LTR, TAR, RRE, PE, SLIP, CRS e INS) e nove genes ('gag, pol, and env, tat, rev, nef, vif, vpr, vpu, e por vezes um décimo tev, que consiste numa fusão de tat, env e rev), codificando 19 proteínas. Três destes genes, gag, pol e env, contêm a informação necessária para produzir as proteínas estruturais de novas partículas virais, por exemplo, o env codifica uma proteína denominada gp160 que é quebrada por uma protease celular de modo a formar gp120 e gp41. Os restantes seis genes, 'tat, rev, nef, vif, vpr, e vpu (ou vpx no caso do VIH-2), são genes reguladores para proteínas que controlam a capacidade do HIV em infectar células, produzir novas cópias de si mesmo (replicar-se) ou provoca a doença (KUIKEN *et al.*, 2008).

Figura 1: Estrutura do Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV)



FONTE: (US National Institute of Health, 2004)

O HIV penetra nos macrófagos e nos linfócitos T CD4⁺ através da adsorção de glicoproteínas na sua superfície para receptores na célula-alvo, seguida pela fusão do envelope viral com a membrana celular e pela libertação do capsídeo do HIV na célula. (CHAN, *et al.*, 1997; CHAN; KIM, 1998).

A penetração na célula tem início com a interação do complexo envelope trímérico (gp160) com o CD4 e um receptor de quimiocina na superfície da célula (geralmente o CCR5 ou CXCR4, embora sejam conhecidos outros). A gp120 liga-se à integrina $\alpha_4\beta_7$, ativando o LFA-1, a principal integrina envolvida no estabelecimento de sinapses virológicas, que facilita a disseminação eficiente do HIV-1 entre células. A gp 160 contém domínios de ligação tanto para o CD4 como para os receptores de quimiocina (CHAN;KIM, 1998; WYATT;SODROSKI, 1998; ARTHOS *et al.*, 2008).

O primeiro estágio na fusão envolve a união dos domínios de ligação CD4 da gp120 ao CD4. Uma vez ligada a gp120 com a proteína CD4, o complexo envelope atravessa uma alteração na estrutura, expondo os domínios de ligação de quimiocina da gp120 e permitindo-lhes interagir com o receptor-alvo de quimiocina. Isto permite uma ligação mais estável, o que permite ao peptídeo de fusão N-terminal gp41 penetrar na membrana celular. Esta estrutura circular aproxima o vírus da membrana celular, permitindo a fusão das suas membranas e consequente entrada do capsídeo viral. Depois do HIV se ligar à célula-alvo, injeta nela o seu RNA e as suas diversas enzimas, incluindo a transcriptase reversa, integrase, ribonuclease e protease (CHAN; KIM, 1998; WYATT; SODROSKI, 1998).

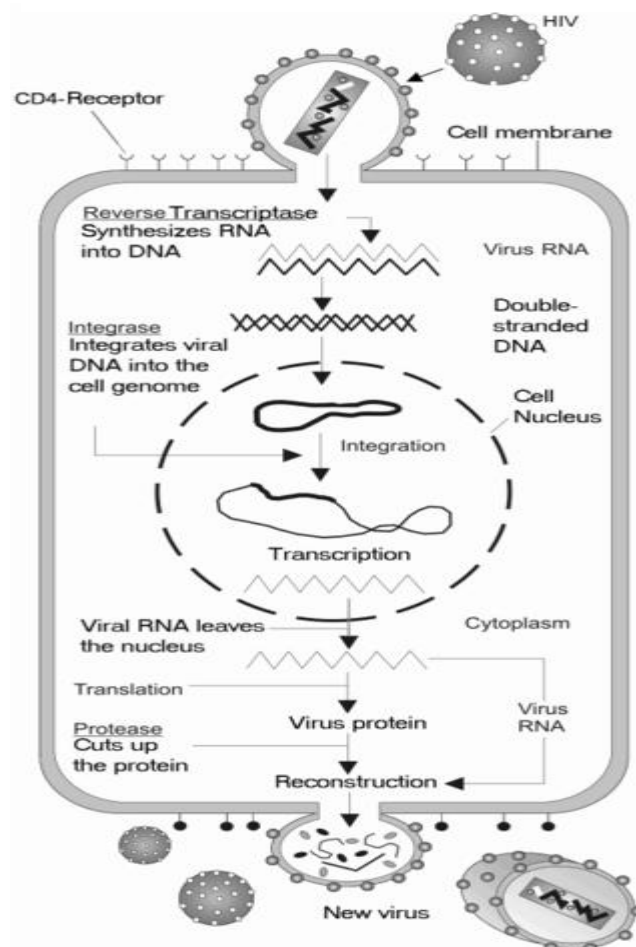
O HIV pode infectar células dendríticas (CD) através do processo CD4-CCR5, embora possa também usar receptores de lectina tipo C. As células dendríticas são uma das primeiras células que o vírus encontra durante a transmissão por via sexual. Atualmente, pensa-se que as CD desempenhem um papel importante na transmissão do HIV para os linfócitos, durante o momento em que o vírus é capturado na mucosa. Acredita-se que a presença da proteína FEZ-1, que ocorre naturalmente em neurônios, impeça que o VIH infecte as células. Pouco depois do capsídeo viral penetrar na célula, uma enzima denominada transcriptase reversa liberta o genoma RNA de cadeia única das proteínas virais, e copia-o para uma molécula complementar de DNA. (POPE; HAASE,2003)

O processo de transcrição reversa é extremamente predisposto a erros e as mutações daí resultantes podem provocar resistência aos antivirais ou permitir ao vírus evadir o sistema imunitário. O DNA viral, agora integrado na célula, pode permanecer dormente durante a fase latente da infecção. Durante a replicação viral, o DNA pró-viral integrado é transcrito para RNAm, que é depois reorganizado através de *splicing* em partes mais pequenas. Estas partes são exportadas do núcleo para o citoplasma, onde são transcritas para as proteínas reguladoras Tat (que incentiva a produção de novos vírus) e Rev. À medida que

as proteínas Rev recém-formadas se acumulam no núcleo, vão-se ligando ao RNAm viral e permitem ao RNA que ainda não sofreu splicing abandonar o núcleo, onde de outra forma são retidos até sofrerem *splicing* (POLLARD; MALIM, 1998; ZHENG et al., 2005).

O último passo do ciclo viral, a montagem dos viriões do novo HIV-1, tem início na membrana de plasma da célula anfitriã. A poliproteína Env (gp160) atravessa o retículo endoplasmático e é transportada para o complexo de Golgi, onde é dividida pela furina, dando origem as duas glicoproteínas do envelope do HIV, gp 41 e gp 120. Estas proteínas são transportadas para a membrana plasmática da célula anfitriã, na qual a gp41 fixa a gp120 à membrana da célula infectada. Este novo virião encontra-se ainda imaturo, uma vez que as poliproteínas Gag precisam ainda de ser separadas em proteínas de matriz, capsídeo e nucleocapsídeo. Esta divisão é mediada pela protease viral e pode ser inibida por fármacos antirretrovirais da classe dos inibidores da protease. Finalmente, os vários componentes são montados de modo a produzir um virião de HIV amadurecido, que são os únicos capazes de infectar outras células (HALLENBERGER et al., 1992; GELDERBLUM, 1997).

Figura 2: Ciclo de replicação do HIV



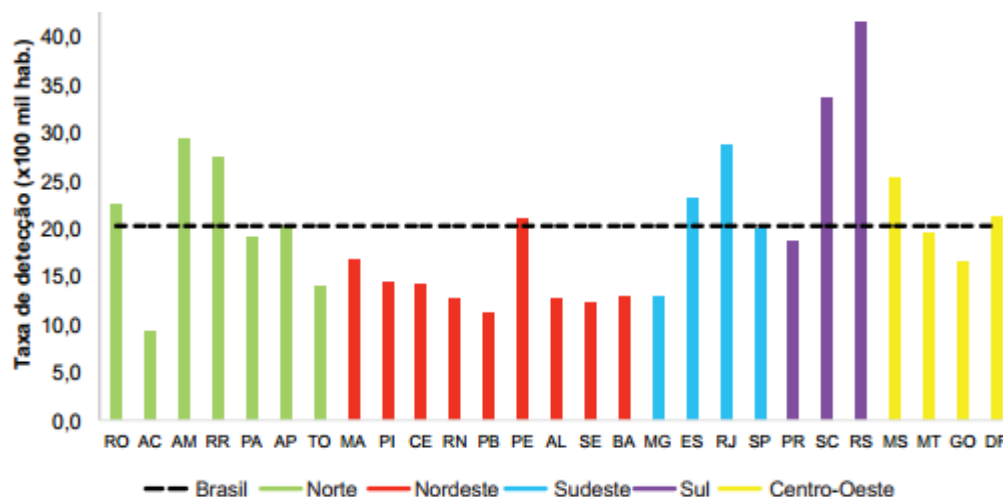
FONTE: <http://commons.wikimedia.org>

3.2 Síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS): Epidemiologia e Políticas Públicas de Saúde

Segundo dados do Boletim Epidemiológico do Ministério da Saúde (2013), durante no ano de 2012, foram notificados 39.185 casos de AIDS no Brasil, através dos sistemas de notificações compulsórias (Sinan, SIM, Siscel/Siclom). Este valor vem mantendo-se estável nos últimos 5 anos. A taxa de detecção nacional foi de 20,2 casos para cada 100.000 habitantes. A maior taxa de detecção foi observada na Região Sul, 30,9/100.000 habitantes, seguida pela Região Norte (21,0), Região Sudeste (20,1), Região Centro-Oeste (19,5), e Região Nordeste (14,8). Nos últimos 10 anos, a taxa de detecção de AIDS no Brasil sofreu uma elevação de cerca de 2% (BRASIL, 2013a).

No entanto, observam-se diferenças significativas entre as cinco regiões do país, no período de 2003 a 2012, observam-se uma diminuição de 18,6% na taxa de detecção na Região Sudeste e 0,3% na Sul, enquanto nas demais regiões observa-se um aumento, sendo de 92,7% na Região Norte, 62,6% na Nordeste e 6,0% na Centro-Oeste (BRASIL, 2013a).

Gráfico 1: Taxa de detecção de AIDS por Unidade da Federação, 2013.

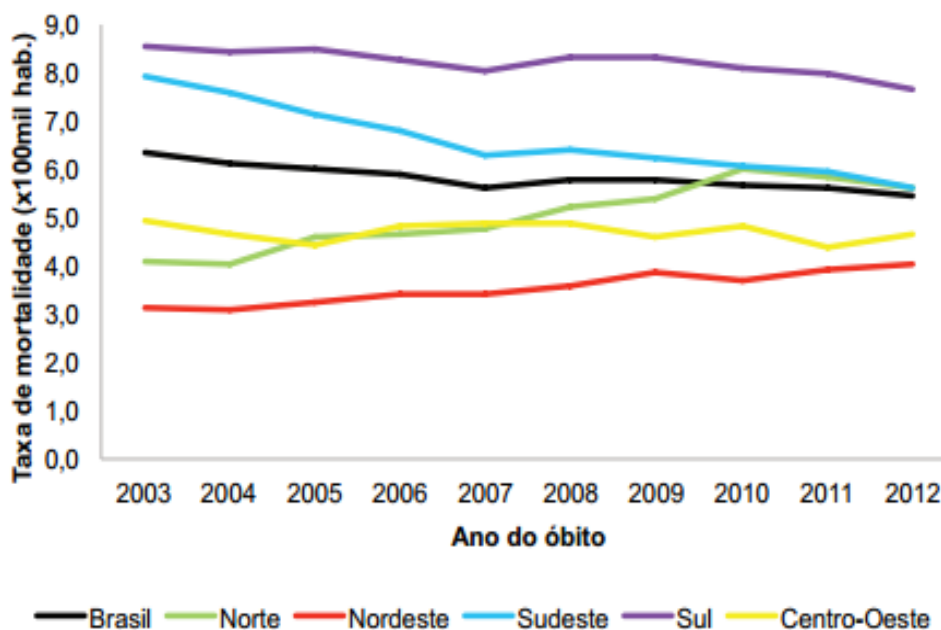


FONTE: Boletim Epidemiológico HIV/AIDS, 2013.

Em 2012, foram declarados 11.896 óbitos por AIDS no Brasil, que corresponde a um coeficiente de mortalidade por AIDS de 5,5 por 100.000 habitantes (coeficiente padronizado). Os coeficientes por região foram: 7,7 na Sul, 5,6 no Norte e Sudeste, 4,7 no Centro-Oeste e 4,0 no Nordeste. Nos últimos 10 anos, observa-se uma redução de 14% na taxa de mortalidade no Brasil. A tendência nos últimos 10 anos do coeficiente de mortalidade

apresenta discrepância entre as regiões: elevação nas regiões Norte (60,0%), Nordeste (33,3%) e Centro-Oeste (4,4%) e redução nas regiões Sudeste (31,7%) e Sul (7,2%) (BRASIL, 2013a).

Gráfico 2: Taxa de mortalidade por AIDS segundo região de residência e ano do óbito. Brasil, 2003 a 2012.



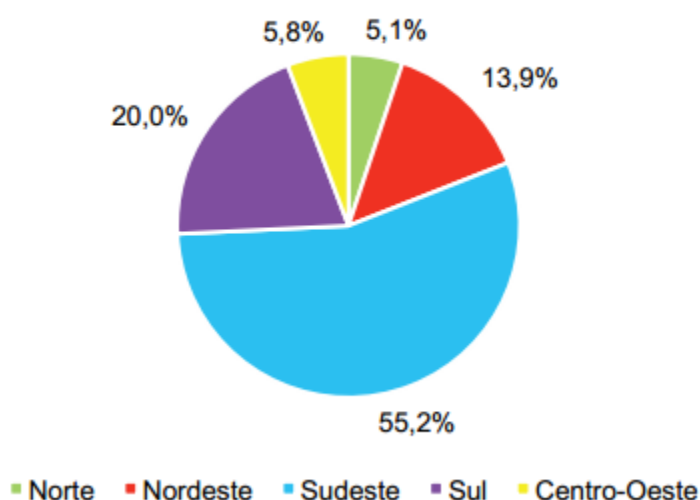
FONTE: Boletim Epidemiológico HIV/AIDS, 2013.

Segundo estimativas realizadas pelo Departamento de DST, AIDS e Hepatites Virais aproximadamente 718 mil pessoas vivem com HIV/AIDS no Brasil. Na população jovem, a taxa de prevalência da infecção pelo HIV apresenta tendência de aumento. Considerando as pesquisas realizadas em Conscritos do Exército Brasileiro, de 17 a 21 anos de idade, a prevalência de infecção pelo HIV passou de 0,09% em 2002 para 0,12% em 2007, sendo que o aumento mais significativo ocorreu na população de HSH (homens que fazem sexo com homens) jovens, cuja prevalência subiu de 0,56% em 2002 para 1,2% em 2007. Com relação aos grupos populacionais com mais de 18 anos em situação de maior vulnerabilidade, estudos realizados em 10 municípios brasileiros entre 2008 e 2009 estimaram taxas de prevalência de HIV de 5,9% entre UD (usuários de drogas), de 10,5% entre HSH e de 4,9% entre PS (mulheres profissionais do sexo) (BRASIL, 2013a).

Com base nesses resultados, verifica-se que a epidemia do HIV no Brasil está concentrada em populações em situação de maior risco e vulnerabilidade, pois estas

apresentam maiores prevalências de infecção pelo HIV quando comparadas à população geral. Considerando os dados acumulados de 1980 a junho de 2013 no Brasil, foram notificados no Sinan, declarados no SIM e registrados no Siscel/Siclom um total de 686.478 casos de AIDS, dos quais 445.197 (64,9%) são do sexo masculino e 241.223 (35,1%) do sexo feminino. Do total de casos registrados entre 1980 e junho de 2013, 379.045 (55,2%) são da Região Sudeste; 137.126 (20,0%) da Região Sul; 95.516 (13,9%) da Região Nordeste; 39.691 (5,8%) da Região Centro-Oeste; e 35.100 (5,1%) da Região Norte (BRASIL, 2013a).

Gráfico 3: Distribuição percentual de casos de AIDS por região de residência. Brasil, 1980 a 2013.



FONTE: Boletim Epidemiológico HIV/AIDS, 2013.

Atualmente, os esforços para o controle da epidemia de HIV/AIDS, no Brasil, estão concentrados no diagnóstico precoce da infecção e no tratamento das PVHA, bem como a implementação de intervenções de prevenção combinada. A estratégia de tratamento de PVHA como medida de prevenção requer não somente o diagnóstico oportuno da infecção, como também o investimento na melhoria do cuidado contínuo desses indivíduos (MONTANER, 2013).

No Brasil, a cobertura de teste de HIV na população sexualmente ativa é de quase 40%, semelhante aos percentuais observados nos Estados Unidos. Além disso, a proporção de indivíduos infectados pelo HIV virgens de tratamento que chegaram ao serviço de saúde com CD4 superior a 500 células por mm³ passou de 28,9% em 2003 para quase 37% em 2012. No entanto, apesar de se observar uma tendência de diminuição desde 2008, aproximadamente

29% dos indivíduos infectados pelo HIV ainda chegam ao serviço de saúde com CD4 inferior a 200 células por mm³ (PASCOM *et al*, 2010; CDC, 2011).

O novo foco para o combate à epidemia de HIV/AIDS, no país, é a implementação de intervenções de prevenção combinadas, com destaque para o protocolo de tratamento como prevenção. Nesse contexto, o monitoramento do cuidado contínuo, a “cascata”, tornou-se importante ferramenta para o acompanhamento dos principais resultados relacionados ao controle da epidemia de HIV/AIDS. O estímulo à TARV para todas as pessoas infectadas pelo HIV, independentemente de seu estado imunológico, é uma importante medida de saúde pública, uma vez que, além de impactar a morbidade e mortalidade, auxilia na diminuição da carga viral, reduzindo, assim, a transmissibilidade do vírus (BRASIL, 2013a).

3.3 Terapia antirretroviral

Os medicamentos antirretrovirais surgiram na década de 1980, para impedir a multiplicação do vírus no organismo, o uso é fundamental para aumentar o tempo e a qualidade de vida de quem é portador da doença. Desde 1996, o Brasil distribui gratuitamente os medicamentos necessários para todos que necessitam do tratamento. Segundo dados de 2012, 313 mil pessoas recebem regularmente os remédios para tratar a doença. Atualmente, existem 25 fármacos anti-HIV aprovados pelo FDA para utilização terapêutica no tratamento da AIDS, divididos em seis classes: Inibidores nucleosídeos de transcriptase reversa (INTR), inibidores nucleotídeos de transcriptase reversa (INTTR), inibidores não-nucleosídeos de transcriptase reversa (INNTR), inibidores de protease (IP), inibidores de entrada celular ou inibidores de fusão (IF), inibidores de co-receptores (ICR) e inibidores de integrase (INI) (ANDRADE; FREITAS; OLIVEIRA, 2011).

Segundo o Comitê Assessor em Terapia Antirretroviral em Adultos e Adolescentes Infectados atualmente, os critérios para início da TARV foram modificados tornando mais precoce o início da TARV, incluindo a indicação do tratamento para pessoas assintomáticas com contagem de linfócitos CD4+ < 350 células/mm³. Para assintomáticos com contagem de linfócitos CD4+ entre 350 e 500 células/mm³, o tratamento passa a ser considerado nas seguintes situações: presença de nefropatia secundária ao HIV; idade > 55 anos; co-infecção HBV e/ou HCV; risco cardiovascular elevado; presença de neoplasia mesmo não definidora de AIDS e carga viral > 100 mil cópias/mL (HALLAL *et al.*, 2010).

O esquema de tratamento inicial recomendado no Brasil é a dupla de inibidores nucleosídeos da transcriptase reversa (INTR) zidovudina (AZT) e lamivudina (3TC) associado a um inibidor não-nucleosídeo da transcriptase reversa (INNTR), preferencialmente o efavirenz. Os inibidores da protease (IP) são alternativos e quando indicados, são recomendados preferencialmente o lopinavir-r e alternativamente o atazanavir-r. Os demais IP são indicados conforme teste de genotipagem ou condições específicas, como por exemplo, o saquinavir como alternativa para pacientes que necessitam utilizar rifampicina para tratamento da tuberculose (HALLAL *et al.*, 2010).

3.4 Propriedades de Lamivudina (3TC) e Zidovudina (AZT)

Em 1987, o órgão norte-americano de controle sobre produtos farmacêuticos FDA (Food and Drug Administration), aprovou para fins comerciais, o primeiro fármaco com atividade antirretroviral a azidotimidina ou zidovudina (AZT ou ZDV), que foi utilizada para o tratamento de portadores do HIV. Ele inibe o vírus HIV-1, HIV-2, o vírus-1 da leucemia T/linfoma em humanos e outros retrovírus de mamíferos. Em 1995, a lamivudina (3TC) teve seu uso aprovado pelo FDA. Ela atua inibindo a replicação do vírus HIV e possui atividade contra o vírus da hepatite B (STYRT *et al.*, 1996; ZHOU; SOMMADOSSI, 1997; AOKI, 1999).

Ambos fármacos são agentes antirretrovirais da classe dos inibidores nucleosídios da transcriptase reversa (INTR). Atualmente, eles são utilizados na terapia antirretroviral combinada com o objetivo de aumentar a supressão viral, prevenir a resistência aos fármacos e simplificar a posologia (HAVLIR; LANGE, 1998).

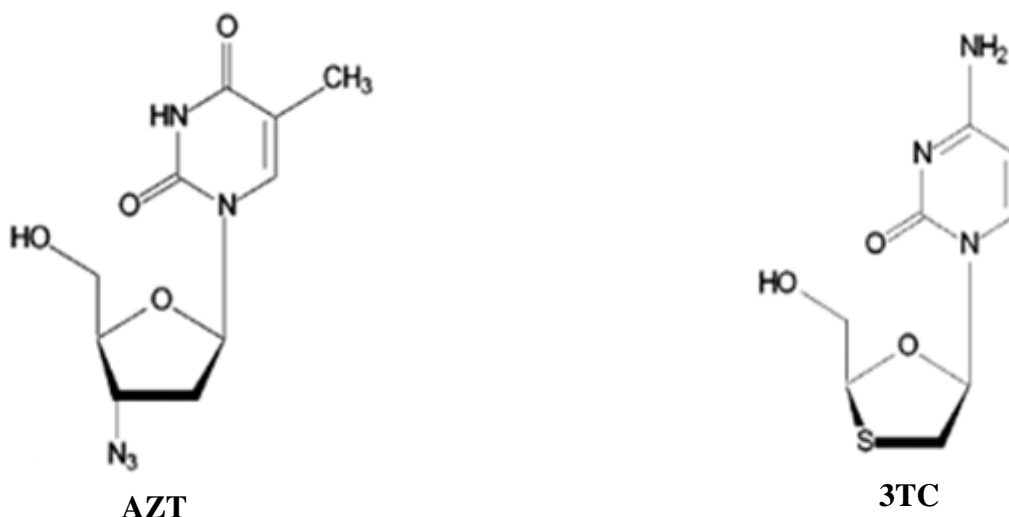
A administração conjunta de ZDV e 3TC e mais um inibidor da protease ocasionou aumento de 3,5% no sucesso da terapêutica, comparativamente ao uso dos mesmos fármacos em comprimidos separados. A complexidade da terapêutica antirretroviral, devido à variedade dos regimes de dosagem, associados a toxicidade, muitas vezes contribuem para erros ou não aderência ao tratamento pelos pacientes o que pode ser minimizado pelo uso de um medicamento contendo associação de ZDV e 3TC (MOYER *et al.*, 1999; ERON *et al.*, 2000).

A ZDV é semelhante à timidina endógena, diferenciando apenas pela presença de um grupo azido (N3) no anel ribose ao invés de hidroxila na posição 3. Ela apresenta-se neutra na

faixa de pH, que varia de 3,5 a 5,5 e pKa igual a 9,8. Apresenta-se como pó cristalino e acastanhado e suas partículas demonstram polimorfismo, possui temperatura de fusão em torno de 124°C, ligeiramente solúvel em água e solúvel em etanol. Possui poder rotatório específico +60,5° à +63,0°, à 25°C, em relação à substância dessecada (VEAL; BACK, 1995; AOKI, 1999; MESPLET *et al.*, 2001, BRASIL, 2010).

A 3TC é uma citidina sintética, 2',3'-didesoxinucleosídeo, com configuração absoluta 2*R*, 5*S* não natural. Ela é uma didesoxipirimidina, em que o carbono 3' do anel da ribose é substituído por enxofre. A lamivudina é o enantiômero (-); o enantiômero (+) possui maior toxicidade. Apresenta-se como pó branco a branco-amarelado, com pka igual a 4,3 (protonação do grupo NH₂). Este fármaco, quando dissolvido em água destilada, encontra-se primariamente sob a forma não-ionizada. Ela é facilmente solúvel em água, ligeiramente solúvel em metanol e etanol e insolúvel em acetona. Possui ponto de fusão entre 176°C à 178°C e poder rotatório específico: -135° à 146°. O pH da solução aquosa a 1% (p/V) é 6,9. Dados da literatura afirmam que tanto em estado sólido quanto em solução aquosa ela possui elevada estabilidade à luz e à temperatura (JOZWIAKOWSKI *et al.*, 1996; PERRY; FAULDS, 1997; KYOKO *et al.*, 1997; JOHNSON *et al.*, 1999; FERNANDES, 2001; BRASIL, 2010).

Figura 3: Estrutura química da Zidovudina (AZT) e Lamivudina (3TC).



FONTE: Adaptado de (BECK *et al.*, 2007)

3.5 Produção de Antirretrovirais no Brasil

O Ministério da Saúde tem conseguido obter antirretrovirais a um custo mais baixo do que o praticado pela indústria farmacêutica em outros países, isto decorre devido ao programa de aquisição em larga escala e produção em laboratórios estatais, tais como Farmanguinhos/Fiocruz, LAFEPE, IQUECO, Fundação para o Remédio Popular (FURP/SP). (CHEQUER *et al.*, 2001).

Atualmente o MS disponibiliza gratuitamente vinte antirretrovirais, que representam investimentos de R\$ 850 milhões por ano na aquisição dos medicamentos. Desses vinte, oito são objetos de PDP (parcerias de desenvolvimento produtivo com laboratórios estatais e empresas privadas) (FARMANGUINHOS, 2014).

Em 2013 iniciou a troca de tecnologia entre o laboratório norte-americano Bristol-Myers Squibb e o Ministério da Saúde para produzir o antirretroviral Atazanavir. O Sulfato de Atazanavir pertence a classe dos inibidores de protease e constitui uma importante droga para o tratamento de pacientes vivendo com HIV/AIDS. Atualmente, ele é indicado para início de terapia como medicamento preferencial entre os inibidores de protease na composição de esquemas terapêuticos das diretrizes internacionais do Departamento de Saúde dos Estados Unidos, da Sociedade Internacional Antiviral, da Sociedade Clínica Europeia de AIDS e da Organização Mundial da Saúde (OMS). O medicamento é utilizado na fase intermediária do tratamento do HIV/AIDS por 45 mil pessoas, cerca de 20% dos pacientes com a doença são atendidos pelo Sistema Único de Saúde (SUS). A previsão é que a produção nacional comece em 2015 e se complete em 2017, quando termina a patente do Atazanavir. O próximo passo no âmbito da produção de medicamentos para HIV/AIDS, de acordo com o presidente da Farmanguinhos, será a produção de medicamentos na forma de dose fixa combinada (DFC), segundo ele, a meta é produzir coquetéis com os antirretrovirais: Efavirenz, Lamivudina e Tenofovir (EBC, 2013, FARMANGUINHOS, 2014). O Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco (LAFEPE), desde a década de 90, vem desenvolvendo esforços na pesquisa e desenvolvimento de medicamentos antirretrovirais. Como por exemplo, o LAFEPE foi o primeiro laboratório oficial brasileiro a produzir, em 1994, a zidovudina. Atualmente o LAFEPE dispõe de área dedicada para a produção desses medicamentos, totalizando o estudo de seis fármacos (zidovudina, lamivudina, estavudina, didanosina, indinavir e ritonavir), apresentados em diferentes formas farmacêuticas (comprimido, cápsula, comprimido

revestido, xarope, pó para solução). Os antirretrovirais produzidos pelo LAFEPE são vendidos exclusivamente para o Ministério da Saúde (LAFEPE, 2013).

3.6 Estudos de estabilidade

A estabilidade pode ser elucidada como o período ao qual uma especialidade farmacêutica ou mesmo a matéria-prima isolada, permanece de acordo com os limites especificados ao longo do período de estocagem e uso, com as mesmas condições e características que possuía na data de sua fabricação (SILVA *et al.*, 2009).

A estabilidade de produtos farmacêuticos depende de fatores ambientais, como: temperatura, umidade e luz, e de outros relacionados ao próprio produto como propriedades físicas e químicas de substâncias ativas e excipientes farmacêuticos, forma farmacêutica e sua composição, processo de fabricação, tipo e propriedades dos materiais de embalagem (BRASIL, 2005).

Os estudos são projetados com a finalidade de garantir a integridade química, física, microbiológica, terapêutica e toxicológica do fármaco e da forma farmacêutica a fim de prever, determinar ou acompanhar o prazo de validade e o período de utilização dos produtos farmacêuticos em embalagem e condições de armazenamento especificadas (BRASIL, 2005).

Com a finalidade de avaliar a estabilidade são realizados testes de degradação forçados em que o produto é submetido a estudos que fornecem evidências de como a qualidade pode sofrer variações no decorrer do tempo. Estes estudos têm sido realizados pela indústria farmacêutica há muito tempo, mas tornou-se um requisito regulamentar formal com a introdução do guia intitulado, "Teste de Estabilidade de novas substâncias medicamentosas e os produtos" (Q1A) na Conferência Internacional sobre Harmonização (ICH) em 1993 (SANTOS, 2013).

Na última década, muitos estudos sobre degradação forçada de produtos farmacêuticos foram relatados na literatura. No entanto, nem todos atendem a qualidade exigida pelas agências de regulamentação. Isto ocorre devido à falta de padronização dos testes, uma vez que, ainda não há um consenso sobre os procedimentos a serem seguidos, ocorrem variações extremas nos procedimentos utilizados pelas companhias farmacêuticas para a obtenção dos resultados, sendo observada a condução dos estudos sem respaldo científico. Existem situações em que múltiplos relatos sobre a degradação forçada de um mesmo fármaco, por

vezes, possuem resultados contraditórios, com isso os fabricantes enfrentam dificuldades em extrair e sintetizar as informações pertinentes para a apresentação como parte do processo (SINGH *et al.*, 2013).

3.6.1 Testes de degradação forçada

Também conhecidos como testes de estresse, possuem como princípio fundamental a submissão de fármacos e medicamentos à condições extremas. Eles permitem a geração de produtos de degradação através da exposição do insumo farmacêutico ativo e o produto acabado a condições de estresse, como por exemplo, luz, temperatura, calor, umidade, hidrólise ácida e básica, oxidação, fotólise entre outras. A realização desses testes é fundamental para o desenvolvimento e validação de metodologias indicativas de estabilidade (BAKSHI; SIGH, 2002; SILVA *et al.*, 2009; BRASIL, 2013b)

Esses testes proporcionam o desenvolvimento de métodos indicativos de estabilidade com especificidade e seletividade adequada, além de informações sobre as possíveis rotas de degradação de um determinado produto, além dos produtos formados, que poderiam ser produzidos durante o período de armazenamento (REYNOLDS *et al.*, 2002, BRASIL, 2013b).

A natureza do teste de estresse utilizado para o fármaco depende de suas características intrínsecas e da forma farmacêutica a ser desenvolvida. Para o medicamento, o planejamento do estudo deve ser baseado nas propriedades do fármaco e dos excipientes utilizados na formulação, assim como nas condições de armazenamento (ICH 2003; SILVA *et al.* 2009).

Os estudos de degradação forçada devem promover degradação em extensão suficiente a fim de permitir avaliação da formação de produtos de degradação. Os testes devem promover uma degradação superior a 10% (dez por cento) e inferior àquela que levaria à degradação completa da amostra. Nos testes em que a degradação for inferior a 10% (dez por cento), a empresa deve apresentar justificativa técnica fundamentada. Além disso, os resultados dos ensaios servirão de suporte para o desenvolvimento e validação da metodologia de análise dos produtos de degradação formados e para a análise crítica do perfil de degradação do medicamento. (BRASIL 2012; BRASIL, 2013b).

Segundo o Informe Técnico nº 1, de 15 de julho de 2008, os produtos de degradação são impurezas resultantes de alterações químicas que surgem durante a síntese do fármaco e/ou durante o armazenamento do medicamento devido aos efeitos da luz, temperatura, pH, umidade, por exemplo, ou pela reação com um excipiente e/ou devido ao contato com a embalagem primária. Além deste informe à RDC nº 58, de 20 de dezembro de 2013, também preconiza a especificação dos limites dos produtos de degradação, conforme a necessidade de notificação, identificação e qualificação no decorrer dos estudos de estabilidade. Os limites são estabelecidos em detrimento da quantidade máxima do insumo farmacêutico ativo administrado por dia e são expressos como a porcentagem do insumo farmacêutico ativo ou a ingestão total diária (ITD) de um produto de degradação. (BRASIL, 2013b).

O limite de identificação tem sua utilidade em razão de que valores de produtos de degradação com percentual ou valor correspondente acima do estabelecido deverão ter sua estrutura química elucidada e realizada a quantificação individual. Já valores acima do limite de notificação deverão ser reportados nos estudos de estabilidade e estarem inclusos no limite de impurezas totais. E finalmente os valores acima dos limites de qualificação dos produtos que apresentarem sua estrutura química característica que conduzam a classificação como potencialmente tóxicos deverão ter seu perfil de segurança estabelecido através da avaliação da segurança biológica. A tabela 1 apresenta os valores determinados para os parâmetros exigidos em relação ao analito estudado. (BRASIL, 2013b).

Tabela 1: Limites de notificação e qualificação do(s) produto(s) de degradação no decorrer do estudo de estabilidade (BRASIL, 2013).

Tipo de limites	Dose máxima diária	Limites
Limites de notificação	$\leq 1 \text{ g}$	0,01%
	$> 1 \text{ g}$	0,05%
Limites de identificação	$< 1 \text{ mg}$	1,0% ou 5 μg TDI*, o que for menor
	1mg – 10 mg	0,5% ou 20 μg TDI, o que for menor
	10 mg – 2g	0,2% ou 20 mg TDI, o que for menor
	$> 2\text{mg}$	0,10%
Limites de qualificação	$< 10 \text{ mg}$	1,0% ou 50 μg TDI, o que for menor
	10mg – 100mg	0,5% ou 200 μg TDI, o que for menor
	$> 100 \text{ mg} - 2\text{g}$	0,2% ou 3 mg TDI, o que for menor
	$> 2 \text{ g}$	0,15%

(*TDI = Ingestão total diária de um produto de degradação)

3.6.2 Métodos Indicativos de Estabilidade – MIE

São procedimentos analíticos devidamente validados com a finalidade de quantificar a redução da quantidade do insumo farmacêutico ativo após a exposição a condições de degradação. O método indicativo de estabilidade (MIE) pode ser usado para detectar como a estabilidade do fármaco e os produtos de degradação sofrem alterações com o tempo. Ele deve medir com precisão as mudanças na concentração de insumos ativos, sem interferência de outros produtos de degradação, impurezas e excipientes. O desenvolvimento adequado do método indicativo de estabilidade possibilita uma revisão dos estudos de pré-formulação e proporciona o desenvolvimento adequado de estudos de estabilidade e de armazenamento. (FDA, 2000, BLESSY *et al.*, 2013).

Antes de iniciar o desenvolvimento do método, várias propriedades físico-químicas como o valor de pK_a , log P, solubilidade e a absorção máxima da droga devem ser conhecidas,

para fundamentar o desenvolvimento do método por CLAE. O Log P e a solubilidade ajudam a selecionar a fase móvel e o solvente, já o valor de pKa ajuda a determinar o pH da fase móvel. A coluna de fase reversa é a escolha preferencial para o início da separação de componentes de degradação em solução aquosa. Metanol, água e acetonitrila podem ser utilizados como fase móvel em diferentes proporções nas fases iniciais de separação. A seleção entre metanol e acetonitrila para a fase orgânica é baseada na solubilidade do analito. Inicialmente, a proporção água: fase orgânica pode ser mantida a 50:50 e modificações adequadas podem ser feitas no decorrer dos ensaios para se obter uma boa separação dos picos. Caso necessário, por último pode ser adicionado o tampão para se obter uma melhor separação e simetria do pico (BAKSHI; SINGH, 2002).

A variação da temperatura da coluna afeta a seletividade do método, uma vez que os analitos respondem de forma diferente a mudanças de temperatura. A faixa de temperatura deve variar entre 30 à 40°C, para se obter uma boa reprodutibilidade (SYNDER, 1997).

O método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência por fase reversa (FR-CLAE) é amplamente utilizado analiticamente como ferramenta para a separação e quantificação das impurezas e é mais frequentemente associado a um detector de UV. Este ganhou popularidade nos estudos de estabilidade, devido a sua capacidade de alta resolução, sensibilidade e especificidade, parâmetros importantes envolvidos na validação do método analítico (BAKSHI; SINGH, 2002; QIU; NORWOOD, 2007).

Durante o desenvolvimento do método, pode acontecer que o pico da droga esconda uma impureza ou um pico de degradação que co-elui com a droga. Isto requer a análise da pureza do pico, que determina a especificidade do método. Para comprovar a pureza poderá ser feita uma análise direta através do detector de arranjo de fotodiodo (DAD). O DAD fornece informações acerca da pureza espectral dos picos, mas não é aplicável para produtos de degradação que possuem perfis de absorção semelhantes ao fármaco no UV. (RIDDHIBEN, 2011).

O MIE desenvolvido é então validado de acordo com a RDC nº 899 de 29/05/2003 que possui um guia para validação de métodos analíticos que orienta a determinação dos parâmetros de linearidade, exatidão, precisão, especificidade, limite de quantificação e detecção, robustez, dentre outros. Se o método não estiver sob os critérios de aceitação para validação, ele deverá ser modificado e revalidado (RIDDHIBEN, 2011).

3.6.3 Fatores que influenciam a estabilidade de fármacos e medicamentos

De acordo com o informe técnico nº 1, de 15 de julho de 2008 para fins de registro, pós-registro e renovação de medicamentos genéricos e similares, a empresa deverá apresentar estudos iniciais submetendo o medicamento as condições de estresse seguintes: temperatura à 60°C, umidade (75% de UR ou superior), solução oxidativa de peróxido de hidrogênio à 3%, solução hidrolítica ácida e básica de HCL e NaOH, respectivamente, ambas à concentração de 0,1N e fotólise à UVB-fluorescente. O objetivo deste teste não é degradar totalmente o composto, mas sim promover uma degradação de pequena extensão 10-30%. Na ausência total de degradação do composto após 10 dias, o fármaco é considerado estável. Se a degradação for menor que 10% deve-se aumentar as condições de estresse (BRASIL, 2008).

3.6.3.1 Hidrólise

A hidrólise é um processo químico que inclui a decomposição de compostos através da reação com água. É uma das degradações mais comuns e ocorrem sob uma ampla faixa de PH, que deve ser considerada, uma vez que os íons hidrogênio e hidroxila podem acelerar ou retardar o processo de degradação (ANSEL *et al.*, 2007). O estudo hidrolítico ocorre sob condições ácidas e básicas e envolve a catálise de grupos funcionais ionizáveis presentes na molécula. O teste de estresse ácido ou básico envolve a degradação forçada de uma substância sob exposição a condições ácidas ou básicas que geram produtos de degradação primários numa faixa desejável (BLESSY *et al.*, 2013).

A seleção do tipo e a concentração do ácido ou base dependem da estabilidade da substância. Ácido clorídrico ou ácido sulfúrico (0,1-1,0M) para hidrólises ácidas e hidróxido de sódio ou hidróxido de potássio para hidrólises básicas (0,1-1M) são reagentes sugeridos adequados para a hidrólise. Se os compostos submetidos aos testes de estresse são pouco solúveis em água, em seguida, co-solventes podem ser usados para dissolvê-los em HCl ou NaOH. A seleção de co-solventes é baseado na estrutura da substância. As condições de estresse iniciais são realizadas, assumindo que o fármaco seja instável, portanto, sujeito a receber condições mais amenas. Dependendo dos resultados obtidos, aumenta-se ou diminui-se a concentração das condições de reação utilizada (BAKSHI; SINGH, 2000; BAKSHI; SINGH, 2002; ALSANTE *et al.*, 2007; BLESSY *et al.*, 2013).

3.6.3.2 Oxidação

O peróxido de hidrogênio é amplamente utilizado para a oxidação de substâncias medicamentosas em estudos de degradação forçada, mas outros agentes oxidantes, tais como íons metálicos, oxigênio e radicais iniciadores como o azobisisobutironitrila (AIBN) também podem ser usados. A degradação oxidativa envolve um mecanismo de transferência de elétrons para formar ânions e cátions reativos. Aminas, sulfetos e fenóis são suscetíveis a oxidação por transferência de elétrons para se obter N-óxidos, hidroxilamina, sulfonas e sulfóxido. Os grupos funcionais com hidrogênio lábil como carbono benzílico, carbono alílico e carbono terciário são susceptíveis a oxidação para formar peróxidos, hidróxido ou cetona. Estudos relatam o uso do da solução de peróxido de hidrogênio na faixa de concentração entre 0,3 à 30%, em pH neutro, durante sete dias à temperatura ambiente, ou uma degradação máxima não superior à 20%, pode gerar relevantes produtos de degradação (BAKSHI;SINGH, 2000; ALSANTE *et al.*, 2003; BOCCARDI, 2005; GUPTA *et al.*, 2011).

3.6.3.3 Temperatura

As amostras de substâncias farmacêuticas e os medicamentos no estado sólido devem ser expostos ao calor seco e úmido, enquanto medicamentos líquidos devem ser expostos ao calor seco. É um dos fatores ambientais mais importantes envolvidos na degradação de produtos farmacêuticos, visto que, em grande parte dos casos, a velocidade de degradação química aumenta com o aumento da temperatura e não existe um acondicionamento capaz de protegê-los dos efeitos do calor (LEITE, 2005; BLESSY *et al.*, 2013).

3.6.3.4 Fotólise

A maioria dos princípios ativos empregados na preparação de medicamentos apresenta máximos de absorção na região do ultravioleta do espectro eletromagnético. A radiação ultravioleta é muito energética e pode propiciar a clivagem de muitas ligações químicas, ocorrendo a degradação da molécula. Por isso é importante conhecer a fotoestabilidade das drogas utilizadas como medicamentos e os produtos formados devido à fotólise, além de avaliar a toxicidade destes últimos uma vez que o uso terapêutico poderá ser comprometido (SILVA *et al.*, 2009).

Segundo o ICH as amostras de fármacos e medicamentos sólidos e líquidos devem ser expostos a um mínimo de 1,2 milhões lxh e no máximo 6 milhões lxh a 200Wh/m² luz. O comprimento de onda de luz mais utilizado para causar a degradação fotolítica é na faixa de 300 – 800 nm. O estresse pela luz em determinadas condições podem induzir a foto oxidações

pelo mecanismo da produção de radicais livres. Os grupos funcionais, tais como carbonilas, nitro aromáticos, N-óxido, alcenos, arilcloridos, fracas ligações entre C-H e O-H, sulfetos e polienos são suscetíveis de introduzir fotossensibilidade nos produtos farmacêuticos (AHUJA; SCYPINSKI, 2001; ALSANTE *et al.*, 2003; BAERTSCHI; THATCHER, 2006).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

Utilizou-se os seguintes matérias:

- Almofariz
- Bastão de vidro
- Balões volumétricos de 100 mL
- Béquer
- Espátulas
- Kitassato
- Pipetas volumétricas de 10 mL
- Pistilo
- Provetas graduadas de 2000 ml e 50 mL
- Seringas
- Unidades filtrantes descartáveis Millex HV de 0,45 Mm da Millipore® para preparação das amostras para injeção no HPLC
- Membranas de 0,45 Mm de poro em PVDC da Milipore® para filtração da fase móvel.
- Vials

4.1.1 REAGENTES

Foram utilizados os padrões primários e secundários, além dos ativos sob a forma de matéria-prima e comprimido conforme a tabela 2.

Tabela 2: Padrões primários, secundários e ativos utilizados

Padrão Primário	Teor	Fabricante	Lote
Lamivudina	100%	USP Reference Standard	F1K002
Zidovudina	100%	USP Reference Standard	
Padrão secundário	Teor	Fabricante	Lote
Lamivudina	100,87%	LAFEPE	17325
Zidovudina	100,27%	LAFEPE	17429
AZT+3TC 300+150mg(Comprimido)	-----	LAFEPE	13021450
Lamivudina (Matéria-Prima)	-----	ZHEJIANG XINHUA LTD.	17325
Zidovudina (Matéria-Prima)	-----	ZHEJIANG XINHUA LTD.	17429

Os solventes utilizados na fase móvel, metanol e acetonitrila, possuíam grau HPLC. A água ultrapura foi obtida do purificador de água Milli-Q® (Millipore, Milford, EUA). Os demais reagentes estão descritos na tabela 3.

Tabela 3: Reagentes utilizados nas análises

Reagentes	Fabricante	Lote
Acetato de amônio	Fmaia®	42722
Acetonitrila	Merck®	I680330
Ácido acético glacial	Hexis®	K08C88
Ácido clorídrico	Labsynth®	158054
Hidróxido de sódio em lentilhas	Fmaia®	42755
Metanol	J.T.Baker®	M26C01
Metanol	Merck®	I721207
Peróxido de Hidrogênio	Química Moderna®	I9L54

4.1.2 EQUIPAMENTOS

Os equipamentos listados abaixo estavam devidamente calibrados e certificados, alocados no laboratório da Coordenadoria de Pesquisa e Desenvolvimento (COP&D) do LAFEPE.

- Balança Shimadzu®, modelo AW220 (Japão)
- Bomba à vácuo Tecnal®, modelo TE-058.
- Cromatógrafo a líquido Hitachi Elite Lachrom – Merck® (Alemanha) com bomba quaternária L-2130, auto-injetor L-2200, detector L-2400 e arranjo de diodo (DAD) L-2455 e forno para coluna L-2300;
- Lavadora ultra-sônica Unique®, modelo USC-1880 (Brasil);
- PHmetro Engineering® modelo W3B com identificação 42PHM002
- Purificador de Água Millipore® com identificação 42MLQ001

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Método USP36 de Substâncias Relacionadas de zidovudina/lamivudina comprimido (USP, 2013).

4.2.1.1 Sistema cromatográfico

- Coluna: Polaris 3 C18-A 250 x 3,0 mm
- Fluxo: 0,5 mL/min
- Comprimento de onda: 270nm, empregando DAD
- Volume de injeção: 10µL
- Temperatura utilizada: 45°C, com a finalidade de reduzir a viscosidade da fase móvel e melhorar a passagem pela fase estacionária.
- O software EzChrom Elite® foi utilizado para a avaliação dos espectros durante as análises. Descrevendo que a pureza de pico deve estar com valores próximos a 1,000 e a similaridade ser maior que 0,999.

4.2.1.2 Fase móvel

- Solução A: Tampão à 25 mM de acetato de amônio com pH ajustado para 4,0 com ácido acético glacial
- Solução B: Metanol
- Solução C: Acetonitrila
- Diluente: Solução A + Solução B (19:1)

4.2.1.3 Sistema Gradiente de concentração

Tabela 4: Concentração de cada solução (A, B e C) na fase móvel por tempo de corrida.

Tempo (min)	Solução A (%)	Solução B (%)	Solução C (%)
0	95	5	0
15	95	5	0
30	70	30	0
30	70	30	0
38,1	0	0	100
45,0	0	0	100
45,1	95	5	0
60,0	95	5	0

4.3 Ensaios do teste de degradação forçada

a) Soluções de degradação

Foram utilizadas soluções de ácido clorídrico (HCL) 0,1 M, 1,0 M e 5,0 M, hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 M, 1,0 M e 5,0 M, peróxido de hidrogênio (H₂O₂) à 0,03%, 0,3% e 3,0% preparadas de acordo com a Farmacopéia Brasileira 5ª edição, volume 1, 2010.

b) Solução Tampão Acetato de Amônio

Para a preparação do Tampão Acetato de Amônio à 25 mM foi pesado 3,854 g de acetato de amônio que posteriormente foi transferido para um béquer onde foi dissolvido com água ultrapura com o auxílio de um bastão de vidro. Em seguida a solução foi transferida para balão volumétrico de 2000 mL e aferida até o menisco com água ultrapura. O procedimento anterior foi repetido alterando-se as devidas proporções para obtermos uma solução de 1000 mL. Em seguida, as duas soluções foram ajustadas com ácido acético glacial para pH 4,0. Após, as soluções foram filtradas em bomba a vácuo TECNAL® com Membrana filtrante HV PVDF 0,45 µm (Millipore®).

São preparados dois volumes de tampão, uma vez que utilizamos respectivamente para o preparo do diluente e na composição do gradiente de concentração da fase móvel.

c) Solução Diluente

Após o preparo da solução tampão de acetato de amônio, transferiu-se 1900 mL para uma proveta graduada e completou-se o volume para 2000 mL através da transferência de 100 mL de metanol. Obtendo-se, portanto o diluente na concentração desejada (19:1).

d) Preparo do padrão

A solução padrão foi preparada em triplicata, pesou-se 150 mg de lamivudina e 300 mg de zidovudina para balão volumétrico de 100 mL. Em seguida, foram adicionados 50 mL de água ultrapura e submetidas à sonicação por 15 minutos, o volume foi completado com o respectivo solvente. Transferiu-se 10 mL para balões de 100 mL, completando os volumes com o diluente. As soluções foram filtradas através

das unidades filtrantes e transferidas para vials para posterior leitura cromatográfica. A concentração de todas as amostras analisadas foram de 0,15 mg de lamivudina e 0,30 mg de zidovudina por mL.

4.3.1 Preparo das Amostras

4.3.1.2 Comprimidos

Inicialmente foram pesados 10 comprimidos da associação lamivudina e zidovudina 450mg. Em seguida calculou-se o peso médio dos comprimidos que foi de 817,50 mg. Posteriormente realizou-se o cálculo para sabermos qual a massa de comprimidos necessitaríamos para obtermos uma massa de 450 mg de ativo na amostra. Veja o cálculo abaixo:

Como:

824,00 mg de massa do comprimido (valor teórico) → 450,00 mg (z+l) ativo

817,50 mg de massa do comprimido (valor obtido) → **X (z+l) ativo**

$$\mathbf{X (z+l) ativo = 446,45 \text{ mg (z+l) ativo}}$$

Portanto:

817,50 mg de massa do comprimido (valor obtido) → **446,45 mg (z+l)**

Y mg de massa do comprimido → 450 mg (z+l)

Y = 824 mg de massa de comprimido
--

Após o cálculo, os comprimidos foram transferidos para almofariz e submetidos à trituração com pistilo, até obtermos um pó homogêneo. Em seguida foi pesada a massa de comprimido desejada.

4.3.1.3 Matéria-Prima (MIX)

Inicialmente foi feita a mistura da massa do padrão secundário de zidovudina e lamivudina, através de um saquinho de plástico mantido sob agitação, até obtermos uma mistura homogênea na proporção (2:1), respectivamente. Misturamos uma massa total de 9,0 g de ativos em que 6,0g foi de zidovudina e 3,0g de lamivudina. Essa proporção foi usada já que tínhamos como referência

pesar 450 mg de pó para cada amostra em que 150 mg seria de lamivudina e 300 mg de zidovudina.

a) Hidrólise alcalina

As amostras foram preparadas em triplicata pesando-se 824 mg do pó advindo do comprimido e 450 mg do pó obtido da mistura das matérias-primas, valores estes já explicados anteriormente. Em seguida elas foram transferidas para balões volumétricos de 100 mL, aos quais se adicionou 50 mL de solução de hidróxido de sódio à concentração de 0,1M, 1,0M e 5,0M.

Posteriormente as soluções foram submetidas à sonicação por 15 minutos e os volumes foram completados com a respectiva solução de degradação. Pipetou-se 10 mL para balões de 100 mL, completou-se os volumes com o diluente. As soluções foram filtradas e transferidas para vials para posterior leitura cromatográfica. Já as soluções-mãe restantes foram acondicionadas em frascos âmbar para as análises posteriores.

b) Hidrólise ácida

As amostras foram preparadas em triplicata pesando-se 824 mg do pó advindo do comprimido e 450 mg do pó obtido da mistura das matérias-primas. Em seguida elas foram transferidas para balões volumétricos de 100 mL, aos quais se adicionou 50 mL de solução de ácido clorídrico à concentração de 0,1M, 1,0M e 5,0M.

Posteriormente as soluções foram submetidas à sonicação por 15 minutos e os volumes foram completados com a respectiva solução de degradação. Pipetou-se 10 mL para balões de 100 mL, completou-se os volumes com o diluente. As soluções foram filtradas e transferidas para vials para posterior leitura cromatográfica. Já as soluções-mãe restantes foram acondicionadas em frascos âmbar para as análises posteriores.

c) Hidrólise neutra

As amostras foram preparadas em triplicata pesando-se 824 mg do pó advindo do comprimido e 450 mg do pó obtido da mistura das matérias-primas. Em

seguida elas foram transferidas para balões volumétricos de 100 mL, aos quais se adicionou 50 mL de água ultrapura.

Posteriormente as soluções foram submetidas à sonicação por 15 minutos e os volumes foram completados com o respectivo solvente. Pipetou-se 10 mL para balões de 100 mL, completou-se os volumes com o diluente. As soluções foram filtradas e transferidas para vials para posterior leitura cromatográfica. Já as soluções-mãe restantes foram acondicionadas em frascos âmbar para as análises posteriores.

d) Oxidativa

As amostras foram preparadas em triplicata pesando-se 824 mg do pó advindo do comprimido e 450 mg do pó obtido da mistura das matérias-primas. Em seguida elas foram transferidas para balões volumétricos de 100 mL, aos quais se adicionou 50 mL de solução de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) à concentração de 0,03%, 0,3% e 3,0%.

Posteriormente as soluções foram submetidas à sonicação por 15 minutos e os volumes foram completados com o respectivo solvente. Pipetou-se 10 mL para balões de 100 mL, completou-se os volumes com o diluente. As soluções foram filtradas e transferidas para vials para posterior leitura cromatográfica. Já as soluções-mãe restantes foram acondicionadas em frascos âmbar para as análises posteriores.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Matéria-Prima (MIX)

5.1.1 Hidrólise alcalina

NaOH 0,1 M

COLORAÇÃO: As amostras que continham a solução de degradação NaOH 0,1 M mantiveram-se incolor ao longo de todos os tempos estudados. Em relação as amostras que continham a solução de degradação NaOH 1,0 M a partir de 48 horas, tornaram-se levemente amareladas, sendo evidenciando uma tonalidade amarelada mais forte a partir de 72 horas, também notou-se visualmente o aumento da viscosidade com o decorrer do tempo. Já com as amostras em solução de degradação de NaOH 5,0 M, tornaram-se levemente amareladas já no primeiro contato, tornando-se fortemente amareladas já com 24 horas de estudo e o mesmo aumento da viscosidade foi observado visualmente.

TEMPO DE RETENÇÃO RELATIVO: Os produtos de degradação verificados nos estudos e registrados na forma de picos nos cromatogramas foram produtos advindos dos ativos zidovudina e lamivudina. Utilizou-se como base, os trabalhos desenvolvidos no LAFEPE por (SANTOS; SILVA, 2013) em que os ativos foram submetidos aos testes de degradação forçada separadamente. A partir dos tempos de retenção relativa, desses estudos foi possível inferir de qual ativo era advindo certo produto de degradação.

OVERLAY DOS CROMATOGRAMAS E PERCENTUAL DOS ATIVOS:

No tempo zero foram verificados os picos de zidovudina e lamivudina com percentual de 99,48% e 104,36%, respectivamente. A partir de 48 horas foi observado o surgimento de um novo pico com [1] TRR 0,357 DEG B1 e área 188362. Após 7 dias, frente ao padrão comparativo a zidovudina não apresentou decaimento e a lamivudina apresentou redução de 11,6%, nota-se o surgimento de um pico novo com [2] TRR 0,104 DEG B2 e área 603917, já o pico DEG B1 teve

(crescimento de aproximadamente 2 vezes em relação a área no tempo zero) . No tempo de 15 dias, a zidovudina permaneceu sem sofrer decaimento e a lamivudina teve queda de 19,4%. Verificou-se o aumento dos picos DEG B1 e DEG B2 com (crescimento de áreas de aproximadamente 6 e 2 vezes, respectivamente) e o surgimento de um pico novo [3] TRR 0,131 DEG B3 e área 161312. No tempo de 30 dias, a zidovudina não apresentou decaimento e obteve-se 42,6% de degradação de lamivudina, ou seja, uma degradação do ativo superior à 30%, uma vez que os testes tem como objetivo promover uma degradação em pequena extensão, entre 10 e 30%, para possibilitar o posterior isolamento e caracterização físico-química dos produtos de degradação, impedindo também a formação de compostos secundários (BRASIL, 2008). Portanto foi evidenciado que a lamivudina é susceptível às condições de hidrólise alcalina à 0,1 M e que no tempo de 30 dias a degradação ultrapassou o limite preconizado pelo estudo. Os picos DEG B1 e DEG B2 tiveram as suas áreas elevadas (crescimento de 13 e 5 vezes, respectivamente) enquanto que o pico DEG B3 teve uma pequena redução. Houve o surgimento de dois picos novos com [4] TRR 0,145 DEG B4 e [5] TRR 0,171 DEG B5 com áreas de 273559 e 200308, respectivamente. Pode-se inferir que os referidos produtos de degradação DEG B1, B2, B3 e B5 registrados na forma de pico são advindos da lamivudina, uma vez que em estudos de degradação anteriores com o ativo isolado e nas mesmas condições, foram registrados picos com tempos de retenção relativo semelhantes, ao estudo presente, o que também é válido para a zidovudina que originou o DEG B4.

ANÁLISE ESPECTRAL: Na análise de pureza de pico para esta condição tem-se que em 30 dias a lamivudina e a zidovudina apresentam pureza total, equivalente a 1,000000; como mostra o gráfico 4. Indicando assim, ausência de coeluição, ou seja, ausência de qualquer outro componente no mesmo pico. Para a análise de similaridade de picos verifica-se que as amostras de lamivudina e a zidovudina possuem picos similares ao padrão, com valor de similaridade 0,9999 e 1,000000.

Figura 4: Overlay dos cromatogramas na condição de hidrólise alcalina 0,1 M nos tempos zero (verde) e 30 dias (azul)

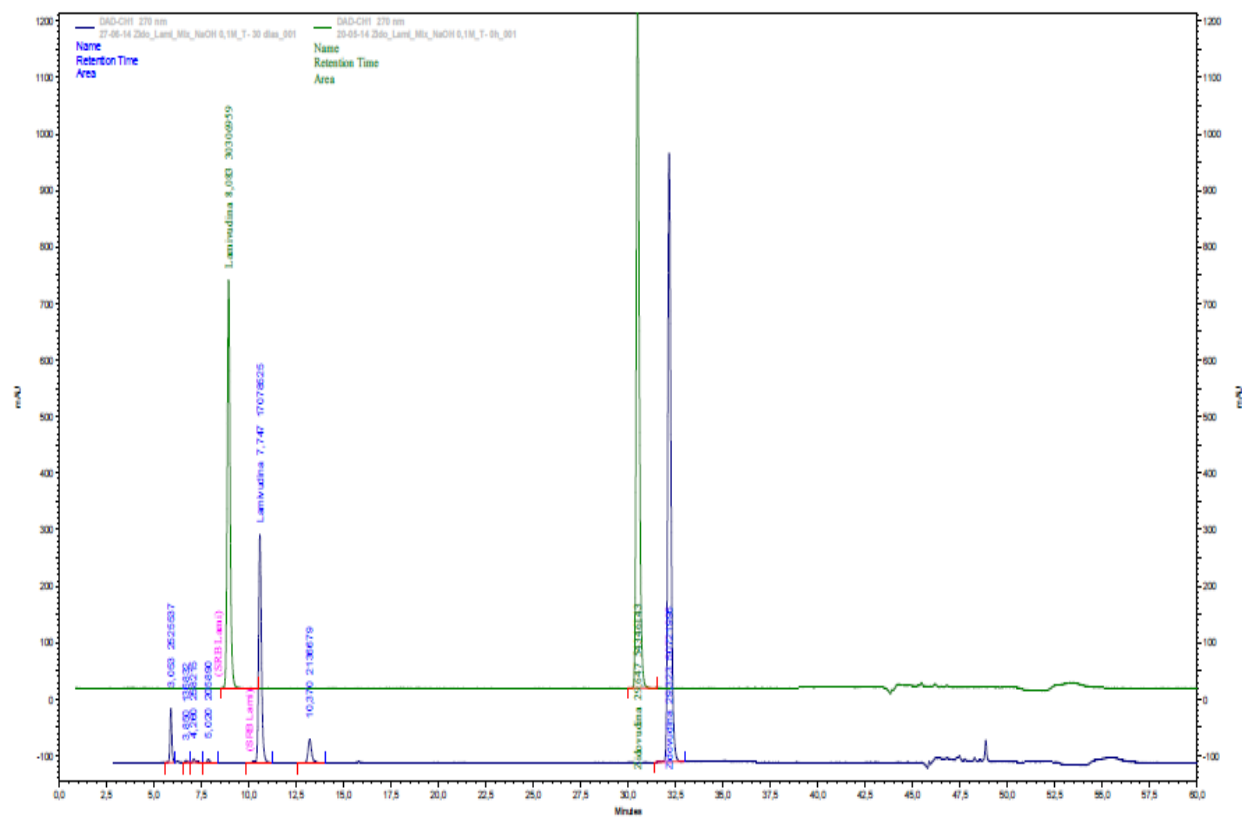
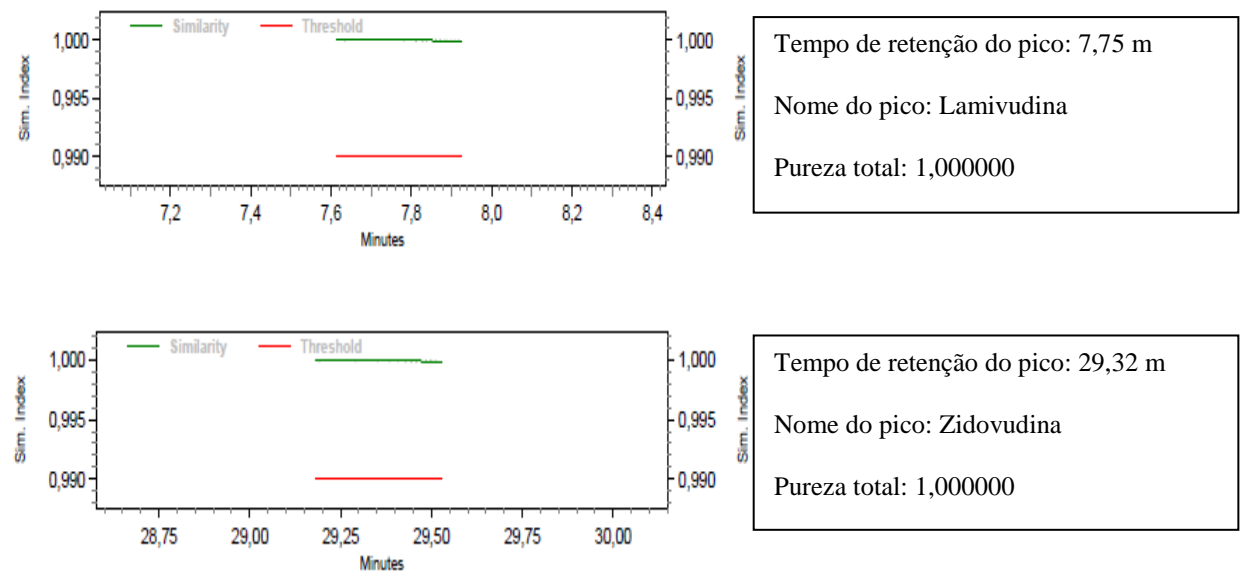
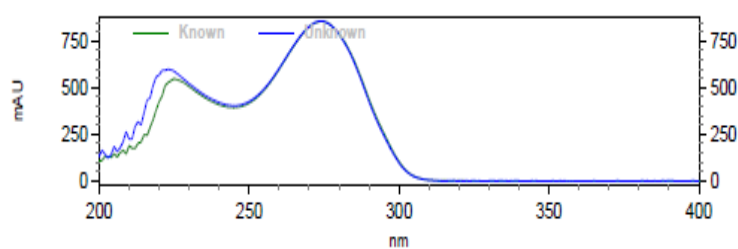


Gráfico 4: Gráficos de pureza e similaridade de picos de lamivudina e zidovudina no estudo de degradação alcalina 0,1 M no tempo de 30 dias (matéria-prima). Para a similaridade o padrão é representado em verde e a amostra em azul

PUREZA DE PICOS – 30 DIAS



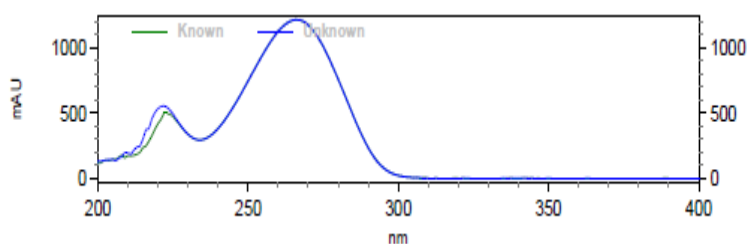
SIMILARIDADE DE PICOS – 30 DIAS



Tempo de retenção do pico: 7,56 m

Nome do pico: Lamivudina

Similaridade: 0,9999



Tempo de retenção do pico: 29,20 m

Nome do pico: Zidovudina

Similaridade: 1,000000

Tabela 5: Áreas e tempos de retenção relativa (TRR) dos picos e teores de lamivudina e zidovudina presentes nas amostras de hidrólise alcalina 0,1 M (matéria-prima) por tempo de estudo

Tempo de estudo	Tempo de retenção relativo (TRR) dos picos em relação à Lamivudina	Tempo de retenção relativo (TRR) dos picos em relação à Zidovudina	Área dos picos	Área de pico 3TC	Área de pico AZT	Teor 3TC (%)	Teor AZT (%)
Zero	-----	-----	-----	33103922	51026588	104,36	99,81
24 Horas	-----	-----	-----	32491762	50575863	102,43	98,93
48 Horas	[1] 1,337	[1] 0,357	188362	33005611	51815080	104,05	101,35
72 Horas	[1] 1,349	[1] 0,357	266214	31254054	49501739	98,53	96,83
7 Dias	[1] 1,344 [2] 0,393	[1] 0,355 [2] 0,104	642064 603917	29249168	49404268	92,21	96,64
15 Dias	[1] 1,340 [2] 0,393 [3] 0,495	[1] 0,355 [2] 0,104 [3] 0,131	1168338 1243878 161312	26664326	49911620	84,06	97,63
30 dias	[1] 1,338 [2] 0,395 [3] 0,497 [4] 0,550 -----	[1] 0,353 [2] 0,104 [3] 0,131 [4] 0,145 [5] 0,171	2390130 2786049 129265 273559 200308	18991829	48243494	59,87	94,37

NaOH 1,0 M

OVERLAY DOS CROMATOGRAMAS: Ao analisar a figura x, para esta condição é possível verificar que no tempo zero foi registrado a presença dos picos de zidovudina e lamivudina com percentual de 109,75% e 104,10%. Em 24 horas, foram registrados dois picos novos com [1] TRR 0,104 DEG B1 e área 865546; e pico [2] TRR 0,361 DEG B2 e área 868529. No tempo de 48 horas, frente ao padrão comparativo, a zidovudina não apresentou decaimento e a lamivudina obteve um decaimento de 19%. Foram registrados dois picos novos com [3] TRR 0,089 DEG B3 e área 236532; e o pico [4] TRR 0,145 DEG B4 e área 184789. Já os picos de DEG B1 e DEG B2 tiveram aumento de área. Em 7 dias a zidovudina e a lamivudina apresentaram decaimento de 10% e 59%, respectivamente, ou seja, a lamivudina já ultrapassou o limite preconizado pelo estudo, ainda assim os estudos prosseguiram para avaliar o decaimento de zidovudina. Neste tempo surgiu um pico novo com [5] TRR 0,171 DEG B5 e área 173128. Foi registrado o aumento de área dos picos de DEG B1, B2 e B4 e o DEG B3 teve uma pequena queda no valor de área. No tempo de 15 dias surgiu um pico novo [6] TRR 0,441 DEG B6 e área 632115, todos os demais picos já mencionados tiveram aumento em sua área. Em 30 dias a zidovudina obteve um decaimento de 13,5% e a lamivudina foi praticamente totalmente degradada. Não houve o surgimento de picos novos e foram registrados os aumentos das áreas dos picos de DEG B1 (5x), B2 (7x), B3 (1x), B4 (2x), B5 e B6 (3x) em relação ao tempo inicial de estudo que foram encontrados. Como na condição anterior pode-se inferir que os picos de DEG B1, B2, B4 e B6 são provenientes da lamivudina, já o pico de DEG B5 é proveniente da zidovudina e o pico de DEG B3 tem origem desconhecida. Portanto da mesma forma que ocorreu com a hidrólise alcalina à 0,1 M, houve decaimento da lamivudina, entretanto nesta nova condição, o percentual de degradação foi maior em tempos de exposição semelhantes ao longo dos tempos estudados. Já a zidovudina, apresentou decaimento, o que não foi registrado anteriormente e dentro do limite aceitável.

ANÁLISE ESPECTRAL: Na análise de pureza de pico para esta condição tem-se que em 30 dias a lamivudina e a zidovudina apresentam pureza total, equivalente a 1,000000; como mostra o gráfico 5. Para a análise de similaridade de picos verifica-se que as amostras de lamivudina e a zidovudina possuem picos similares aos do padrão, com valor de similaridade 0,9989 e 1,000000, respectivamente.

Figura 5: Overlay dos cromatogramas na condição de hidrólise alcalina 1,0 M nos tempos zero (verde), 72 horas (marrom) e 30 dias (azul)

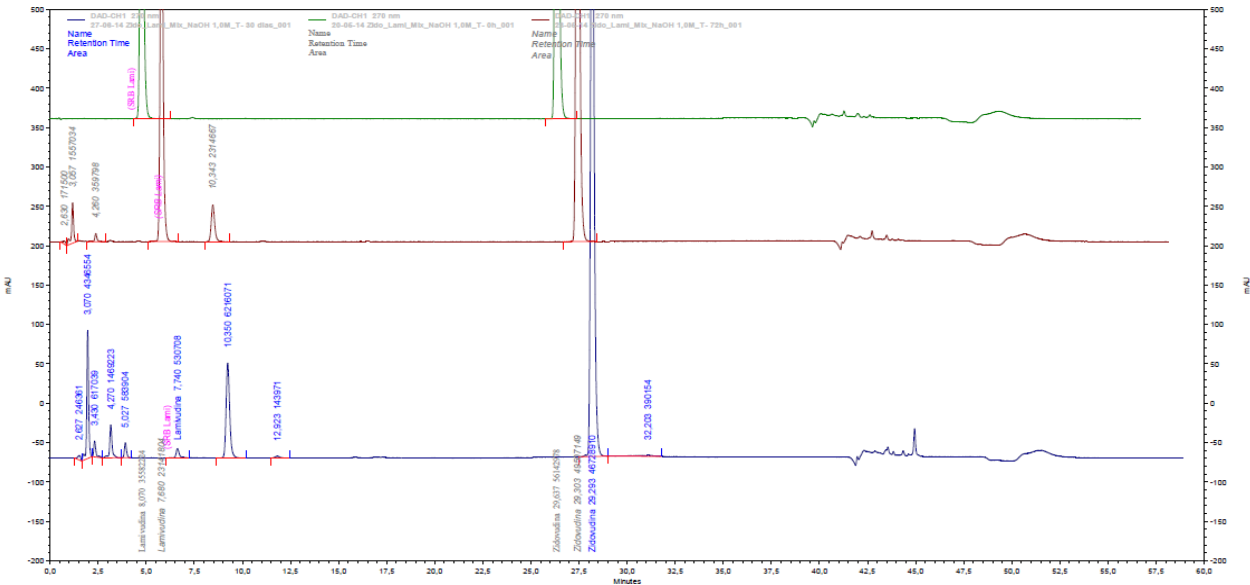
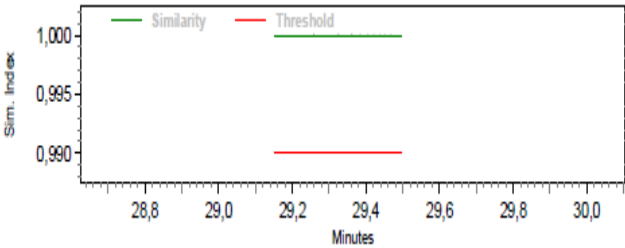
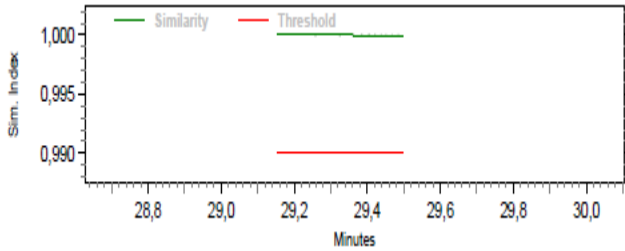


Gráfico 5: Gráficos de pureza e similaridade de picos de lamivudina e zidovudina no estudo de degradação alcalina 1,0 M no tempo de 30 dias (matéria-prima). Para a similaridade o padrão é representado em verde e a amostra em azul.

PUREZA DE PICOS – 30 DIAS

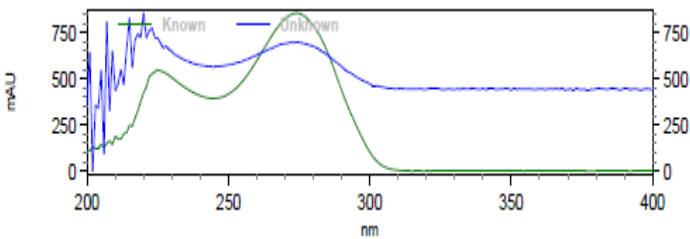


Tempo de retenção do pico: 10,35 m
Nome do pico: Lamivudina
Pureza total: 1,000000

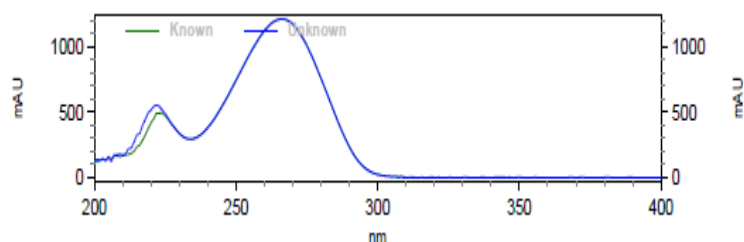


Tempo de retenção do pico: 29,29 m
Nome do pico: Zidovudina
Pureza total: 1,000000

SIMILARIDADE DE PICOS – 30 DIAS



Tempo de retenção do pico: 7,56 m
Nome do pico: Lamivudina
Similaridade: 0,9989



Tempo de retenção do pico: 7,56 m

Nome do pico: Zidovudina

Similaridade: 1,0000

Tabela 6: Áreas e Tempo de Retenção Relativa (TRR) dos picos e teor de lamivudina e zidovudina presentes nas amostras de hidrólise alcalina 1,0 M (matéria-prima) por tempo de estudo

Tempo de estudo	Tempos de Retenção Relativo (TRR) dos picos referentes à Lamivudina	Tempo de Retenção Relativo (TRR) dos picos referentes à Zidovudina	Área dos picos	Área de pico de 3TC	Área de pico de AZT	Teor de 3TC (%)	Teor de AZT (%)
Zero	-----	-----	-----	34813040	53220213	109,75	104,1
24 Horas	[1] 0,379 [2] 1,325	[1] 0,104 [2] 0,361	865546 868529	30585213	51438208	96,42	100,62
48 Horas	[1] 0,389 [2] 1,337 [4] 0,544	[1] 0,104 [2] 0,357 [4] 0,145	1332970 1796127 184789	28152698	52644194	88,75	102,98
72 Horas	[1] 0,398 [2] 1,347 [4] 0,554	[1] 0,104 [2] 0,353 [4] 0,145	1587724 2364157 360691	23631704	49021991	74,50	95,89
7 Dias	[1] 0,395 [2] 1,343 [4] 0,551 -----	[1] 0,104 [2] 0,353 [4] 0,145 [5] 0,171	2773139 4597755 831238 173128	14138882	48003725	44,57	93,9
15 Dias	[1] 0,394 [2] 1,341 [4] 0,550 ----- [6] 0,441	[1] 0,104 [2] 0,354 [4] 0,145 [5] 0,171 [6] 0,116	3900192 6486331 1034586 329993 205242	6602202	49677877	20,81	97,17
30 dias	[1] 0,396 [2] 1,337 [4] 0,551 ----- [6] 0,443	[1] 0,104 [2] 0,353 [4] 0,145 [5] 0,171 [6] 0,117	4424758 6317364 1430115 588788 632115	478535	46041775	1,51	90,06

Tabela 7: Áreas e tempo de retenção relativa (TRR) dos picos de origem desconhecida nas amostras de hidrólise alcalina 1,0 M (matéria-prima) por tempo de estudo

Tempo de estudo	Tempo de Retenção Relativa (TRR)	Área dos picos
Zero	-----	-----
24 horas	-----	-----
48 horas	[3] 0,089	236532
72 horas	[3] 0,089	168640
7 dias	[3] 0,089	204309
15 dias	[3] 0,089	270777
30 dias	[3] 0,089	251900

NAOH 5,0 M

OVERLAY DOS CROMATOGRAMAS E PERCENTUAL DOS ATIVOS: Foi verificado no tempo zero de estudo a presença dos picos de zidovudina e lamivudina com percentual de 93,4% 88,6%, respectivamente. Inicialmente já foram registrados cinco picos advindos da degradação dos ativos. Os picos [1] com TRR 0,091 DEG B1 e área 438377; [2] com TRR 0,103 DEG B2 e área 1533943; [3] com TRR 0,129 DEG B3 e área 217940; [4] com TRR 0,143 DEG B4 e área 495049 e [5] com TRR 0,347 DEG B5 e área 522769. Em 24 horas, frente ao padrão comparativo, a zidovudina apresentou decaimento de 8% e a lamivudina atingiu 50% de decaimento, portanto acima do limite aceitável, mesmo assim as análises prosseguiram para avaliar o decaimento do outro ativo. Neste tempo, não houve o surgimento de picos novos e todas as áreas dos picos encontrados anteriormente tiveram aumento, como é possível visualizar na tabela x. No tempo de 48 horas de estudo houve o aumento das áreas de todos os picos DEG B1 (1x), B2 (4x), B3 (1x), B4 (21x) e B5 (12x), em relação ao tempo inicial. Também surgiram dois picos novos com [6] TRR 0,116 DEG B6 e área 205848 e [7] com TRR 0,163 DEG B7 e área 234306. Em 72 horas, a zidovudina apresentou um decaimento de 25% e a lamivudina já havia decaído praticamente 90%. Apenas o pico de DEG B3 não teve aumento de área e surgiu um pico novo com [8] TRR 0,172 DEG B8 e área 120387. No último tempo de 7 dias, a zidovudina sofreu um decaimento de 46,6%, ou seja, fora do limite e a lamivudina foi praticamente completamente degradada. Não foram registrados picos novos e os picos de DEG B1, B2, B4 e B5, tiveram suas áreas reduzidas em relação à análise anterior, além disso o pico de DEG B3 não foi registrado, essas reduções de áreas e o não registro de um pico que vinha sendo registrado, pode ter sido ocasionado devido a formação de produtos de degradação secundários, que não foram detectados. Ainda foi verificado, o aumento das áreas dos picos de DEG B6 (6x), B7 (2x), e B8 (1,1x). Assim como nos estudos anteriores, pode-se inferir que os picos de DEG B2, B4, B5, B6 e o pico de DEG B8 são provenientes de produtos de lamivudina e zidovudina, respectivamente. Já os picos de DEG B1, B3 e B7, possuem origem desconhecida. Portanto, na condição de hidrólise básica NaOH à 1,0 M, ambos fármacos mostraram-se susceptíveis, sendo que a lamivudina teve decaimento mais rápido em comparação com os mesmos tempos de estudo anteriores, o mesmo é válido para a zidovudina.

ANÁLISE ESPECTRAL: Na análise de pureza de pico para esta condição tem-se que em 24 horas a lamivudina e a zidovudina apresentam pureza total, equivalente a 1,000000; como mostra o gráfico 6. Para a análise de similaridade de picos verifica-se que as amostras de lamivudina e a zidovudina possuem picos similares ao padrão, com valor de similaridade 0,9999 e 1,000000.

Figura 6: Overlay dos cromatogramas na condição de hidrólise alcalina 5,0 M nos tempos zero (verde) e 24 horas (preto)

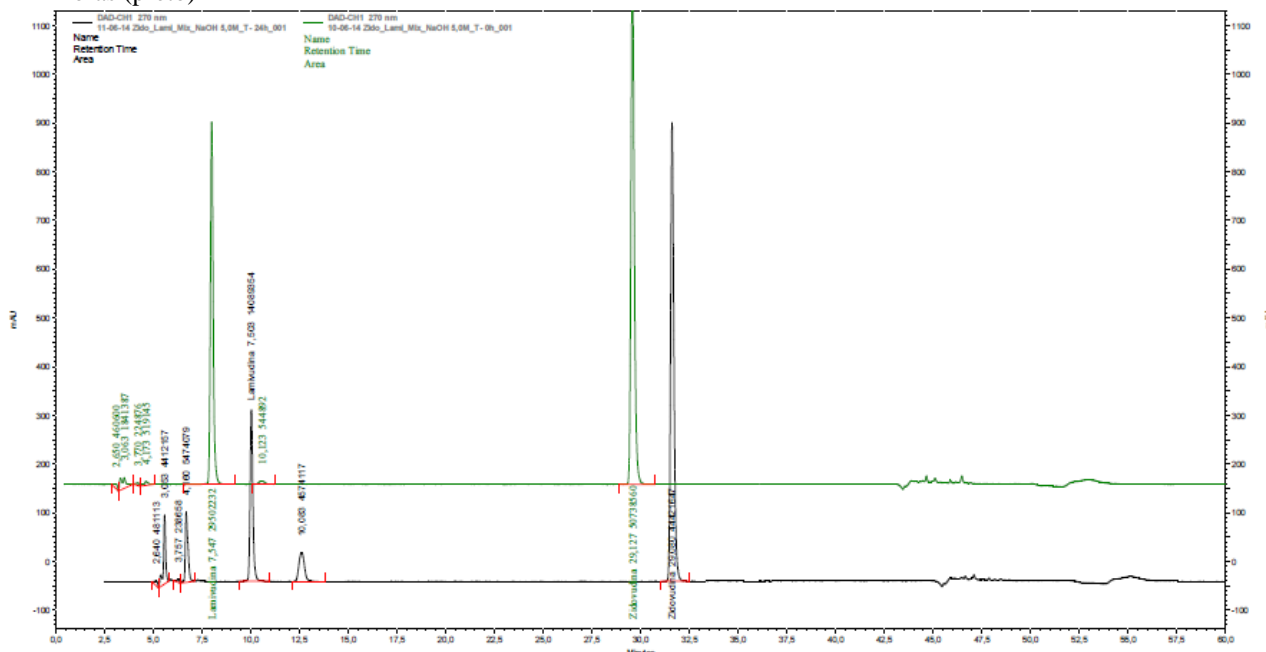
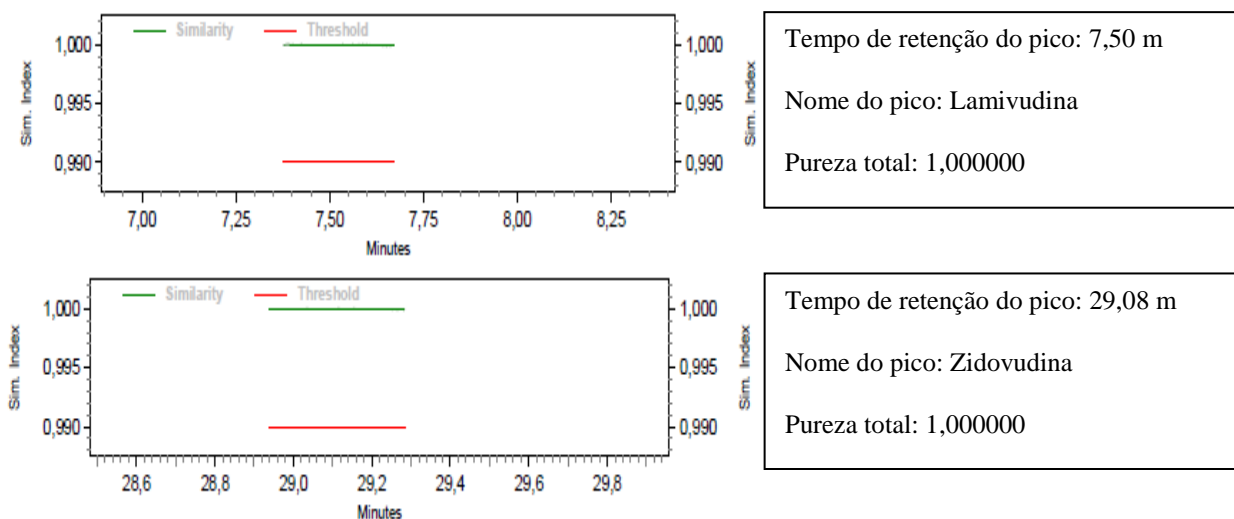
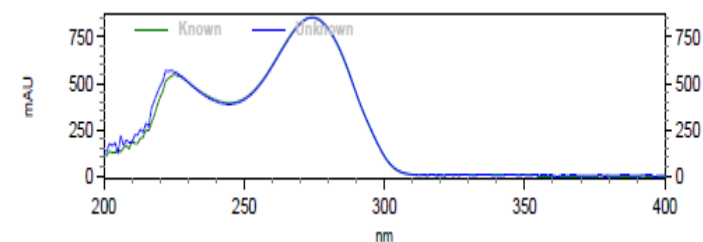


Gráfico 6: Gráficos de pureza e similaridade de picos de lamivudina e zidovudina no estudo de degradação alcalina 5,0 M no tempo de 24 horas (matéria-prima). Para a similaridade do padrão é representado em verde e a amostra em azul

PUREZA DE PICO – 24 HORAS



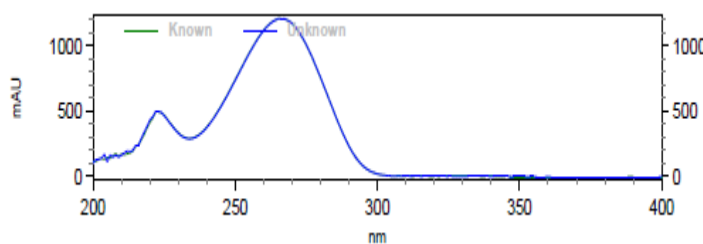
SIMILARIDADE DE PICOS – 24 HORAS



Tempo de retenção do pico: 7,58 m

Nome do pico: Lamivudina

Similaridade: 0,9999



Tempo de retenção do pico: 29,20 m

Nome do pico: Zidovudina

Similaridade: 1,0000

Tabela 8: Áreas e tempo de retenção relativa (TRR) dos picos de origem desconhecida nas amostras de hidrólise alcalina 5,0 M (matéria-prima) por tempo de estudo

Tempo de estudo	Tempo de Retenção Relativa (TRR)	Área dos picos
Zero	[1] 0,091	438377
	[3] 0,129	217940
24 horas	[1] 0,091	469795
	[3] 0,129	240312
48 horas	[1] 0,091	455248
	[3] 0,125	270903
	[7] 0,163	234306
72 horas	[1] 0,091	467347
	[3] 0,124	270485
	[7] 0,160	375294
7 dias	[1] 0,090	431280
	[7] 0,165	453799

Tabela 9: Áreas e Tempos de retenção relativa (TRR) dos picos e teor de lamivudina e zidovudina presentes nas amostras de hidrólise alcalina 5,0 M (matéria-prima) por tempo de estudo

Tempo de estudo	Tempo de Retenção Relativo (TRR) dos picos relacionados à Lamivudina	Tempo de Retenção Relativo (TRR) dos picos relacionados à Zidovudina	Área dos picos	Área de pico de 3TC	Área de pico de AZT	Teor de 3TC (%)	Teor de AZT (%)
Zero	[2] 0,397 [4] 0,553 [5] 1,341	[2] 0,103 [4] 0,143 [5] 0,347	1533943 495049 522769	28120480	48166718	88,65	93,96
24 Horas	[2] 0,407 [4] 0,554 [5] 1,343	[2] 0,105 [4] 0,143 [5] 0,347	4448497 5497788 4610685	14039343	44301661	44,26	86,66
48 Horas	[2] 0,407 [6] 0,451 [4] 0,554 [5] 1,343	[2] 0,105 [6] 0,116 [4] 0,143 [5] 0,346	6245285 205848 10416493 6004481	6082617	39390351	19,18	77,05
72 Horas	[2] 0,402 [6] 0,445 [4] 0,548 [5] 1,338 -----	[2] 0,105 [6] 0,116 [4] 0,143 [5] 0,349 [8] 0,172	6697984 336756 12394975 6972783 120387	3108038	36137834	9,80	70,69
7 Dias	[2] 0,399 [6] 0,443 [4] 0,548 [5] 1,340 -----	[2] 0,105 [6] 0,116 [4] 0,144 [5] 0,351 [8] 0,172	5820009 1172412 12133878 5274732 138392	199179	25649513	0,63	50,17

5.1.2 Hidrólise ácida

HCL 0,1 M

COLORAÇÃO: As amostras que continham a solução de degradação HCL 0,1 M e HCL 1,0 M mantiveram-se incolor ao longo de todos os tempos estudados. Em relação as amostras que continham a solução de degradação HCL 5,0 M a partir do tempo de 72 horas, tornaram-se levemente acastanhadas, sendo evidenciando uma tonalidade acastanhada mais forte em 7 dias.

OVERLAY DOS CROMATOGRAMAS E PERCENTUAL DOS ATIVOS: Foi verificado no tempo zero do estudo a presença dos picos de zidovudina e lamivudina com percentual de 97,6% e 103,3%, respectivamente. Não houve o surgimento de picos de degradação até os 15 dias de estudo. Em 30 dias houve o surgimento de um pico com [1] TRR 0,352 DEG A1 e área 196969. Pode-se inferir que o referido produto de degradação registrado na forma de pico é advindo da lamivudina, uma vez que em estudos de degradação anteriores com o ativo isolado e nas mesmas condições, foi registrado o pico com tempo de retenção relativo semelhante. Neste tempo final, frente ao padrão comparativo, a lamivudina e a zidovudina não apresentaram decaimento, portanto ambos fármacos não são susceptíveis à esta condição.

ANÁLISE ESPECTRAL: Na análise de pureza de pico tem-se que em 30 dias a zidovudina e a lamivudina apresentaram pureza total, equivalente a 1,000000, como mostra o gráfico 7. Indicando assim, ausência de qualquer outro componente no mesmo pico. Para a análise de similaridade de picos verifica-se que as amostras de lamivudina e a zidovudina possuem picos similares ao padrão, com valor de similaridade 0,9999 e 1,000000.

Figura 7: Overlay dos cromatogramas na condição de hidrólise ácida 0,1M nos tempos zero (verde) e 30 dias (azul)

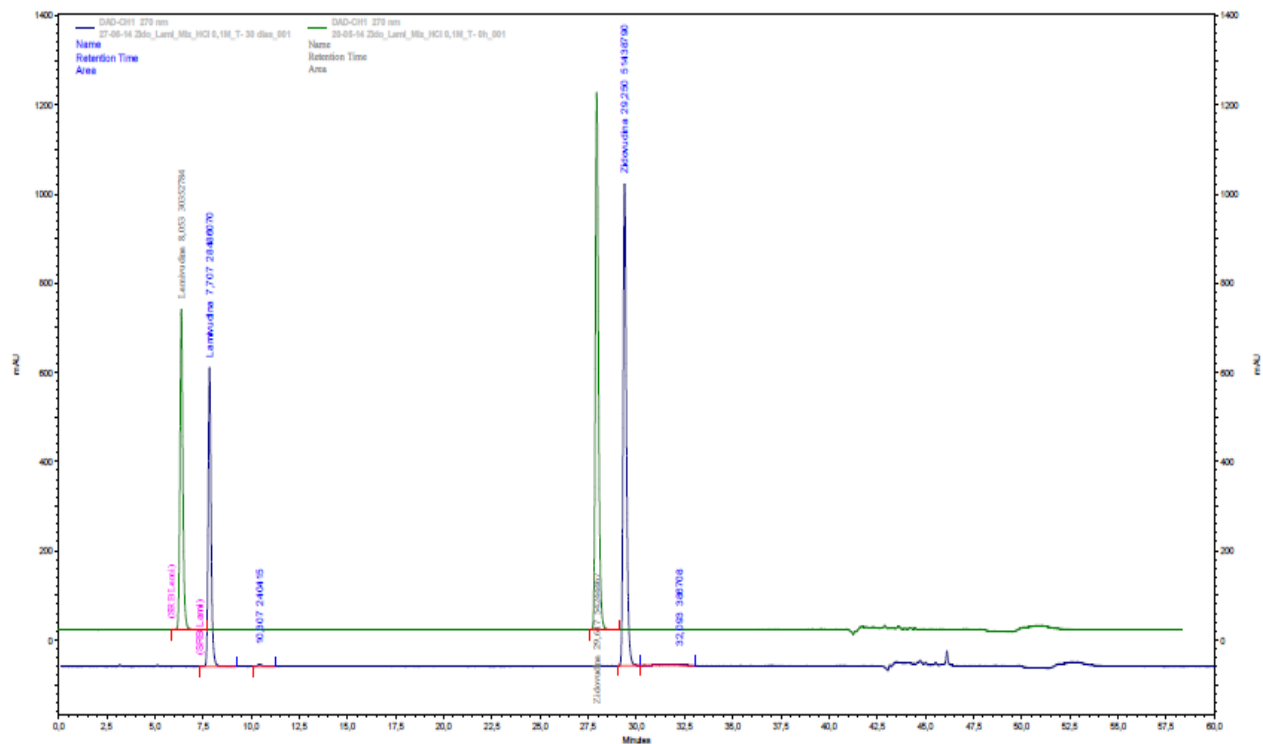
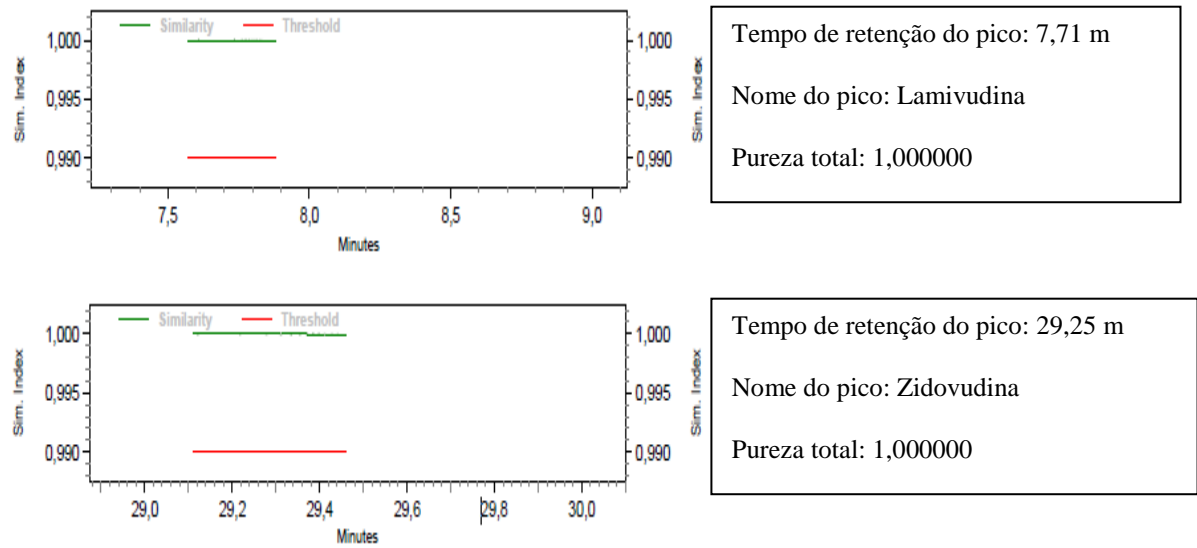
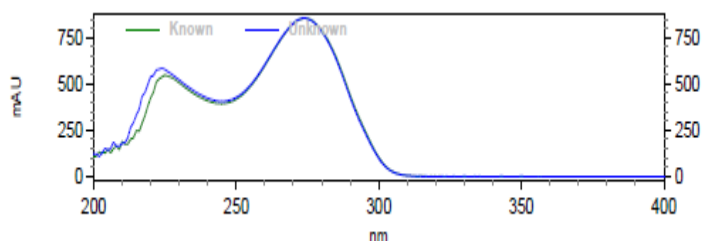


Gráfico 7: Gráficos de pureza e similaridade de picos de lamivudina e zidovudina no estudo de degradação ácida 0,1 M no tempo de 30 dias (matéria-prima). Para a similaridade o padrão é representado em verde e a amostra em azul.

PUREZA DE PICOS – 30 DIAS



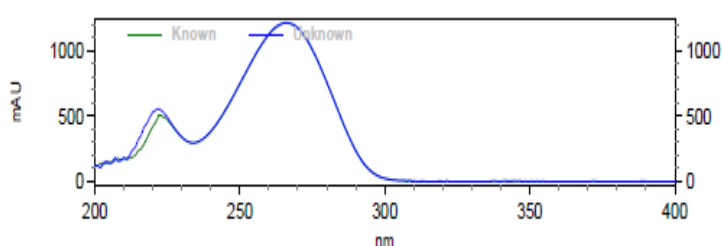
SIMILARIDADE DE PICOS – 30 DIAS



Tempo de retenção do pico: 7,56 m

Nome do pico: Lamivudina

Similaridade: 0,9999



Tempo de retenção do pico: 29,20 m

Nome do pico: Zidovudina

Similaridade: 1,0000

Tabela 10: Áreas e Tempo de Retenção Relativa (TRR) dos picos e teor de lamivudina e zidovudina presentes nas amostras de hidrólise ácida 0,1 M (matéria-prima) por tempo de estudo

Tempo de estudo	Tempo de retenção relativo (TRR) dos picos em relação à Zidovudina	Tempo de retenção relativo (TRR) dos picos em relação à Lamivudina	Área dos picos	Área de pico de 3TC	Área de pico de AZT	Teor de 3TC (%)	Teor de AZT (%)
Zero	-----	-----	-----	30953926	51396475	97,58	103,26
24 Horas	-----	-----	-----	30686772	52391986	96,74	102,48
48 Horas	-----	-----	-----	30471790	51250719	96,06	100,25
72 Horas	-----	-----	-----	30266326	51144922	95,42	100,04
7 Dias	-----	-----	-----	30224580	51212338	95,28	100,17
15 Dias	-----	-----	-----	29949298	50888768	94,42	99,54
30 dias	[1] 0,352	[1] 1,337	196969	29709534	50832217	93,66	99,43

HCL 1,0 M

OVERLAY DOS CROMATOGRAMAS E PERCENTUAL DOS ATIVOS: Foi verificado no tempo zero do estudo a presença dos picos de zidovudina e lamivudina em percentual de 104,2% e 96,3%, respectivamente. Não houve o surgimento de picos de degradação até às 72 horas de estudo. Em 7 dias, houve o surgimento de um pico com [1] TRR 0,104 DEG A1 e área 176191 e outro pico [2] TRR 0,171 DEG A2 e área 170944. No tempo de 15 dias, não surgiram picos novos e houve aumento nas áreas dos picos de DEG A1 e DEG A2. No tempo final de 30 dias, não houve decaimento frente ao padrão comparativo dos ativos, zidovudina e lamivudina, além disso surgiu um pico novo com [3] TRR 0,352 DEG A3 e área 131114; e foram registrados os aumentos das áreas dos picos de DEG A1 e DEG A2 (4x) em relação ao tempo inicial que foram observados. Portanto, assim como na condição anterior ambos fármacos não são susceptíveis a esta condição.

ANÁLISE ESPECTRAL: Na análise de pureza de pico tem-se que em 30 dias a zidovudina e a lamivudina apresentaram pureza total, equivalente a 1,000000, como mostra o gráfico 8. Indicando assim, ausência de qualquer outro componente no mesmo pico. Para a análise de similaridade de picos verifica-se que as amostras de lamivudina e a zidovudina possuem picos similares ao padrão, com valor de similaridade 0,9999 e 1,0000.

Figura 8: Overlay dos cromatogramas na condição de hidrólise ácida 1,0 M nos tempos zero (verde) e 30 dias (azul).

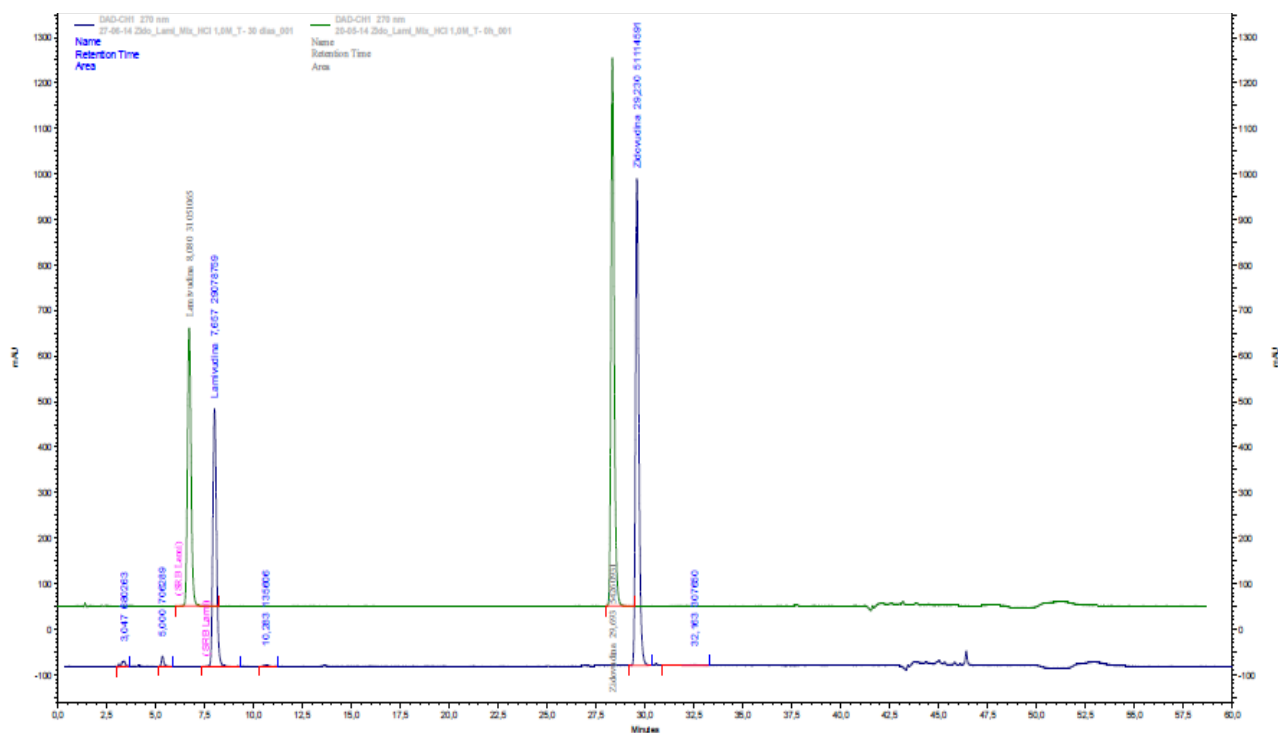
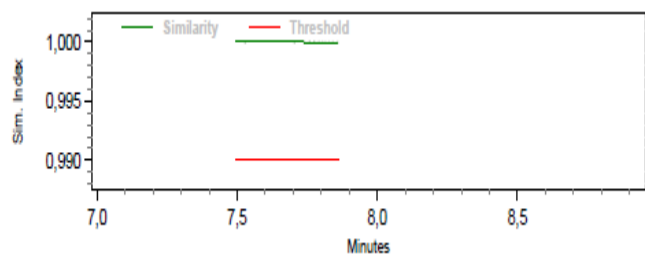


Gráfico 8: Gráficos de pureza e similaridade de picos de lamivudina e zidovudina no estudo de degradação ácida 1,0 M no tempo de 30 dias (matéria-prima). Para a similaridade o padrão é representado em verde e a amostra em azul.

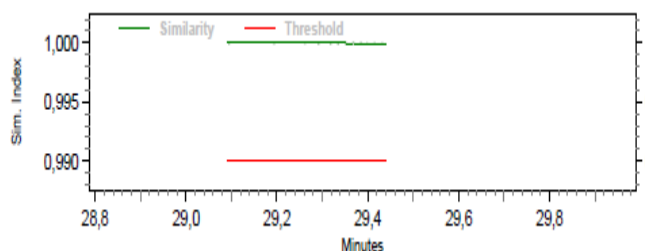
PUREZA DE PICOS – 30 DIAS



Tempo de retenção do pico: 7,66 m

Nome do pico: Lamivudina

Pureza total: 1,000000

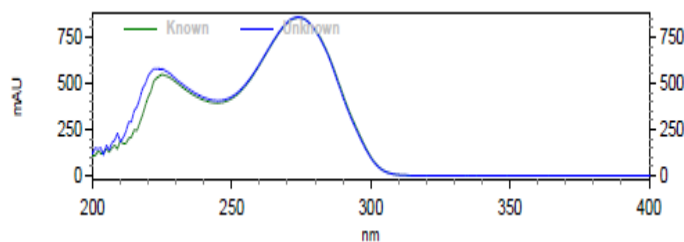


Tempo de retenção do pico: 29,20 m

Nome do pico: Zidovudina

Pureza total: 1,000000

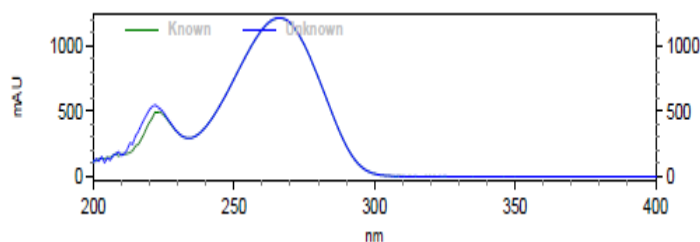
SIMILARIDADE DE PICOS – 30 DIAS



Tempo de retenção do pico: 7,56 m

Nome do pico: Lamivudina

Similaridade: 0,9999



Tempo de retenção do pico: 29,20 m

Nome do pico: Zidovudina

Similaridade: 1,0000

Tabela 11: Áreas e tempo de retenção relativa (TRR) dos picos de origem desconhecida nas amostras de hidrólise ácida 1,0 M (matéria-prima) por tempo de estudo

Tempo de Estudo	Zero	24 horas	48 horas	72 horas	7 dias	15 dias	30 dias
Tempo de retenção relativo (TRR)	-----	-----	-----	-----	[1] 0,104	[1] 0,104	[1] 0,104
Área dos picos	-----	-----	-----	-----	176191	259408	691250

Tabela 12: Áreas e Tempo de Retenção Relativa (TRR) dos picos e teor de lamivudina e zidovudina presentes nas amostras de hidrólise ácida 1,0 M (matéria-prima) por tempo de estudo

Tempo de estudo	Tempo de retenção relativo (TRR) dos picos em relação à Lamivudina	Tempo de retenção relativo (TRR) dos picos em relação à Zidovudina	Área dos picos	Área de pico de 3TC	Área de pico de AZT	Teor de 3TC (%)	Teor de AZT (%)
Zero	-----	-----	-----	30540314	53284682	96,28	104,23
24 Horas	-----	-----	-----	30228856	53188988	95,30	104,04
48 Horas	-----	-----	-----	29894502	51742693	94,24	101,21
72 Horas	-----	-----	-----	29893356	51940496	94,24	101,60
7 Dias	-----	[2] 0,171	170944	29780395	51775109	93,88	101,28
15 Dias	-----	[2] 0,171	290678	29326299	512296621	92,45	100,34
30 dias	----- -----	[2] 0,171 [3] 0,351	718724 131114	30116705	51369830	94,94	100,48

HCL 5,0 M

OVERLAY DOS CROMATOGRAMAS E PERCENTUAL DOS ATIVOS: Foi verificado no tempo zero do estudo, a presença dos picos de zidovudina e lamivudina com percentual de 99,8% e 101,7%, respectivamente. Neste tempo surgiu um pico com [1] TRR 0,097 DEG A1 e área 886227. Em 24 horas, frente ao padrão comparativo, não houve decaimento dos ativos zidovudina e lamivudina; o pico DEG A1 teve aumento de área e surgiram três picos novos com [2] TRR 0,171 DEG A2 e área 745027, [3] TRR 0,906 DEG A3 e área 159169, [4] TRR 1,034 DEG A4 e área 764204. Nos tempos subsequentes de 48H, 72H e 7 dias, todos os picos registrados tiveram aumento de área, o pico de DEG A1 (4x), DEG A2, DEG A3, DEG A4 (5X), para cada em relação ao tempo inicial que foram identificados e não surgiram picos novos. Neste último tempo de estudo, a zidovudina e a lamivudina obtiveram um decaimento de aproximadamente 25 % e 30%, respectivamente, ou seja, dentro do limite aceitável. Assim como nas condições anteriores, pode-se inferir que os referidos produtos de degradação registrados nas formas de picos DEG A2, A3, A4 são advindos da zidovudina e que o pico de DEG A1 possui origem desconhecida. Portanto, diferentemente das condições de hidrólise ácida nas concentrações anteriores, neste caso foi registrado à susceptibilidade de ambos fármacos.

ANÁLISE ESPECTRAL: Na análise de pureza de pico tem-se que em 7 dias a zidovudina e a lamivudina apresentaram pureza total, equivalente a 1,000000, como mostra o gráfico 9. Indicando assim, ausência de qualquer outro componente no mesmo pico. Para a análise de similaridade de picos verifica-se que as amostras de lamivudina e a zidovudina possuem picos similares ao padrão, com valor de similaridade 0,9907 e 1,0000.

Figura 9: Overlay dos cromatogramas na condição de hidrólise ácida 5,0 M nos tempos zero (verde) e 7 dias (preto)

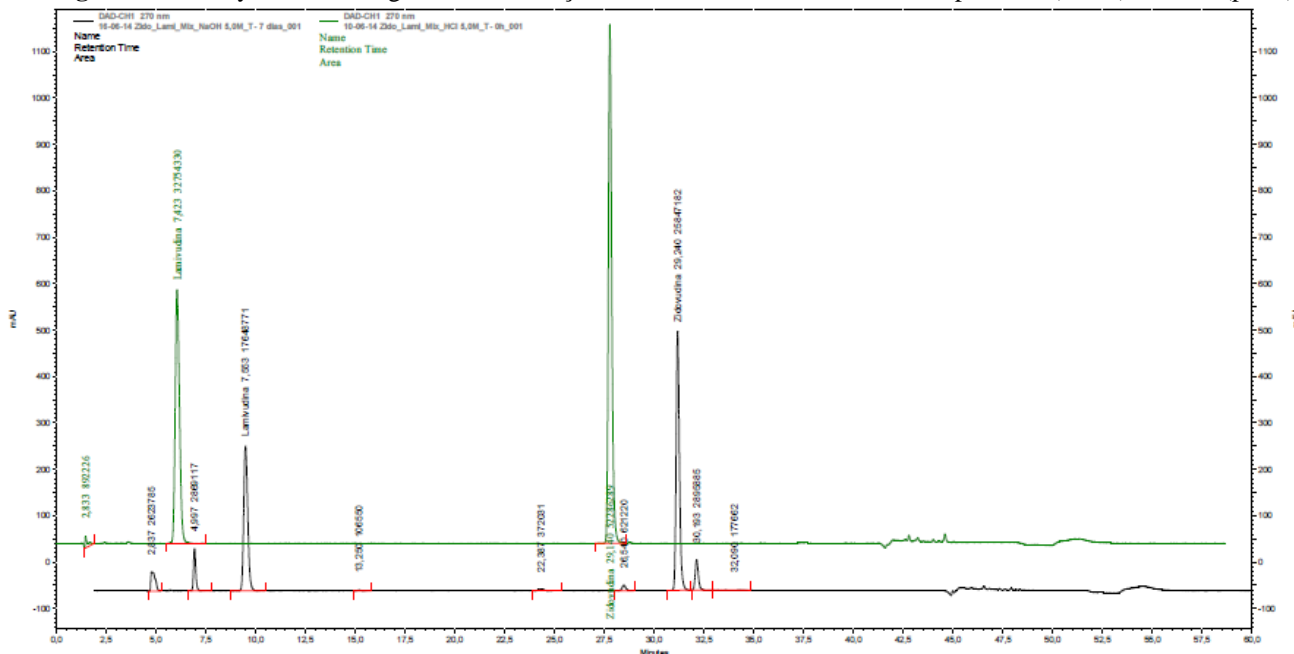
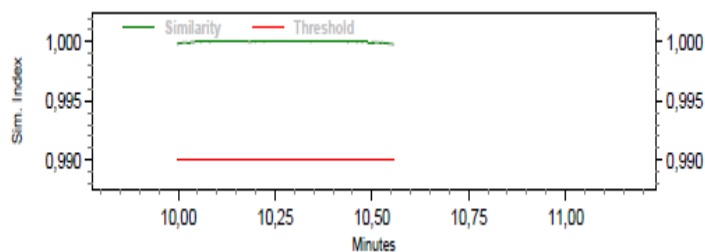


Gráfico 9: Gráficos de pureza e similaridade de picos de lamivudina e zidovudina no estudo de degradação ácida 5,0 M no tempo de 7 dias (matéria-prima). Para a similaridade o padrão é representado em verde e a amostra em azul.

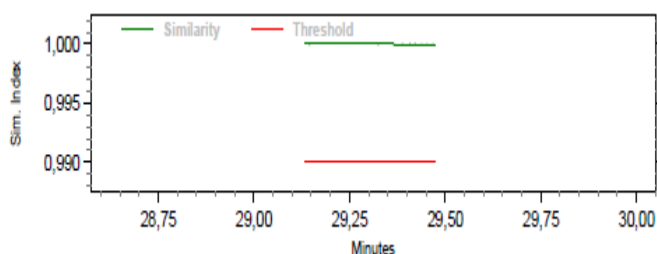
PUREZA DE PICOS – 7 DIAS



Tempo de retenção do pico: 10,29 m

Nome do pico: Lamivudina

Pureza total: 1,000000

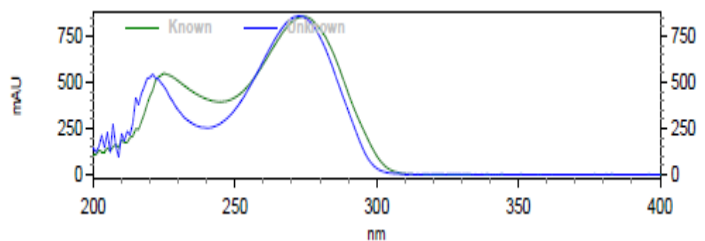


Tempo de retenção do pico: 29,28 m

Nome do pico: Zidovudina

Pureza total: 1,000000

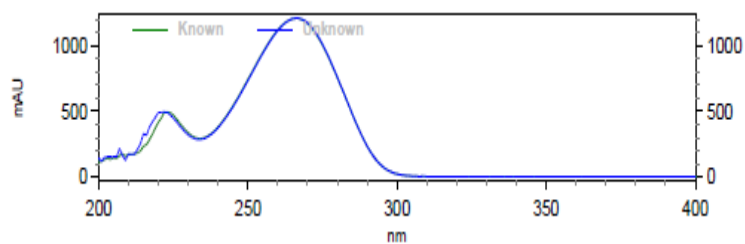
SIMILARIDADE DE PICOS – 7 DIAS



Tempo de retenção do pico: 7,56 m

Nome do pico: Lamivudina

Similaridade: 0,9907



Tempo de retenção do pico: 29,20 m

Nome do pico: Zidovudina

Similaridade: 1,0000

Tabela 13: Áreas e Tempo de Retenção Relativa (TRR) dos picos e teor de lamivudina e zidovudina presentes nas amostras de hidrólise ácida 5,0 M (matéria-prima) por tempo de estudo

Tempo de estudo	Tempo de retenção relativo (TRR) dos picos em relação à Lamivudina	Tempo de retenção relativo (TRR) dos picos em relação à Zidovudina	Área dos picos	Área de pico de 3TC	Área de pico de AZT	Teor de 3TC (%)	Teor de AZT (%)
Zero	-----	-----	-----	32271207	50028868	101,74	99,77
24 Horas	----- ----- -----	[2] 0,171 [3] 0,906 [4] 1,034	745027 159169 764204	31237264	48670519	98,48	95,20
48 Horas	----- ----- -----	[2] 0,171 [3] 0,906 [4] 1,034	1603529 350358 1700949	30552582	46683436	96,32	91,32
72 Horas	----- ----- -----	[2] 0,171 [3] 0,908 [4] 1,033	2227630 477266 2326032	28229876	42693984	89,00	83,29
7 Dias	----- ----- -----	[2] 0,171 [3] 0,908 [4] 1,033	3850162 837615 3895841	24163270	34860676	76,18	68,19

Tabela 14: Áreas e tempo de retenção relativa (TRR) dos picos de origem desconhecida nas amostras de hidrólise ácida 5,0 M (matéria-prima) por tempo de estudo

Tempo de estudo	Tempo de Retenção Relativa (TRR)	Área dos picos
Zero	[1] 0,097	886227
24 horas	[1] 0,098	1388897
48 horas	[1] 0,098	2139861
72 horas	[1] 0,097	2558515
7 dias	[1] 0,097	3741286

5.1.3 Oxidação

H₂O₂ 0,03%

COLORAÇÃO: Em todos os tempos e concentrações de peróxido de hidrogênio (H₂O₂), as amostras em solução degradativa se mantiveram incolor.

OVERLAY E PERCENTUAL DOS ATIVOS: Para esta condição é possível verificar no tempo zero de estudo a presença dos picos de zidovudina e lamivudina com percentual de 89,66% e 92,65%, respectivamente. Neste tempo é observada a presença de um pico de degradação com [1] TRR de 0,128 DEG O1 e área 75895, pode-se inferir que o referido produto de degradação registrado na forma de pico é advindo da lamivudina, uma vez que em estudos de degradação anteriores com o ativo isolado e nas mesmas condições, foi registrado um pico com tempo de retenção relativo semelhante, ao estudo presente.

Após 72 H de estudo, foi evidenciado frente ao padrão comparativo o decaimento de 6,4% da lamivudina e a zidovudina não apresentou decaimento. Verificou-se que o pico DEG O1 apresentou área de 2892052 (crescimento de aproximadamente 38 vezes em relação ao tempo zero).

Em 7 dias, constatou-se um decaimento de 32% da lamivudina e de 16,7% da zidovudina. Neste tempo o pico DEG O1 registrou área 4284561 (crescimento de aproximadamente 54 vezes em relação ao tempo zero). Portanto o teor da lamivudina apresentou neste tempo uma degradação do fármaco superior à 30%. Assim, verifica-se que a lamivudina ultrapassou o limite de degradação desejado, uma vez que a finalidade do estudo é permitir que a degradação ocorresse em pequena extensão, entre 10 e 30%. Contudo o teor de zidovudina apresentou-se dentro do limite aceitável. Portanto evidencia-se que ambos fármacos foram susceptíveis às condições oxidativas à 0,03% de peróxido de hidrogênio, sendo que a lamivudina degrada-se mais rapidamente comparado a zidovudina.

ANÁLISE ESPECTRAL: Na análise de pureza de pico tem-se que em 7 dias a zidovudina e a lamivudina apresentaram pureza total, equivalente a 1,000000, como mostra o gráfico 10. Indicando assim, ausência de qualquer outro componente no mesmo pico. Para a análise de similaridade de picos verifica-se que as amostras de

lamivudina e a zidovudina possuem picos similares ao padrão, com valor de similaridade 0,9998 e 1,000000.

Figura 10: Overlay dos cromatogramas na condição de degradação por oxidação (H_2O_2 0,03%) nos tempos zero (preto) e 7 dias (verde)

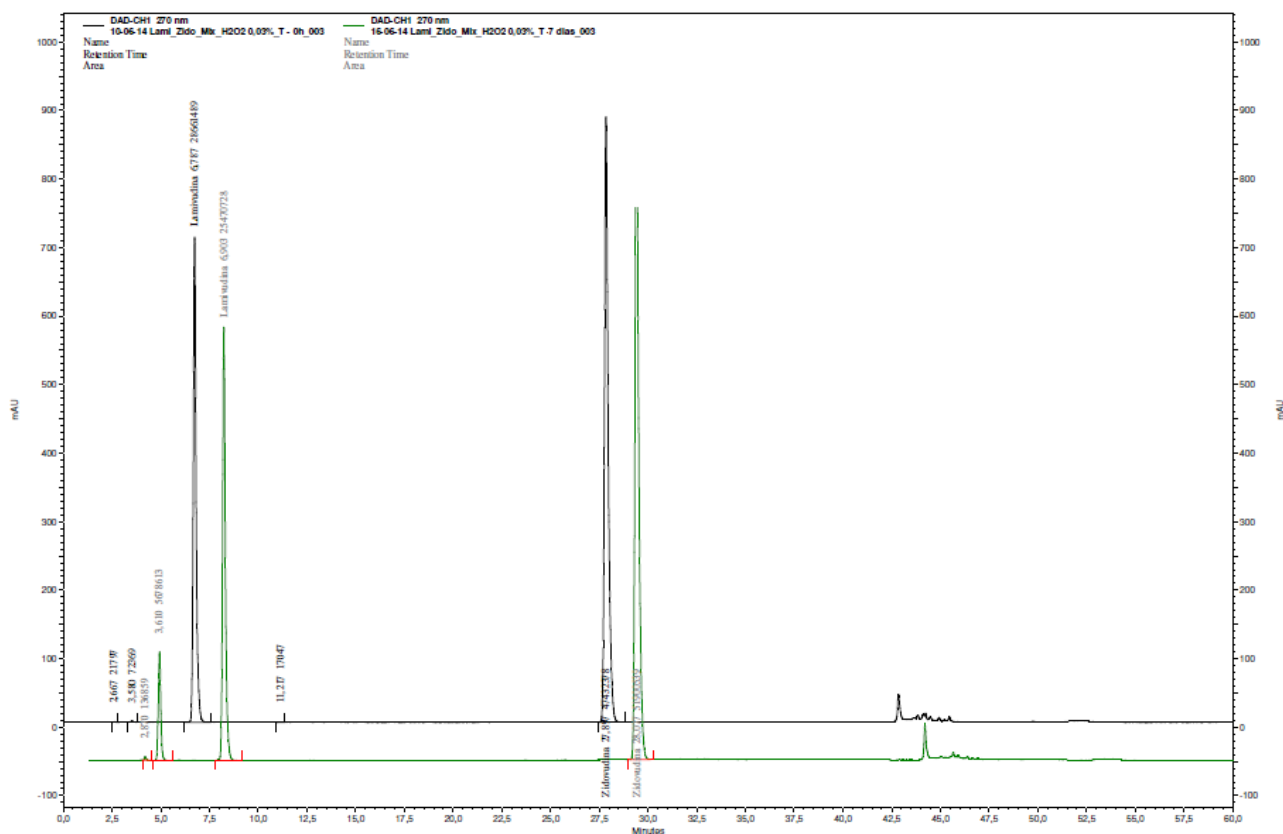
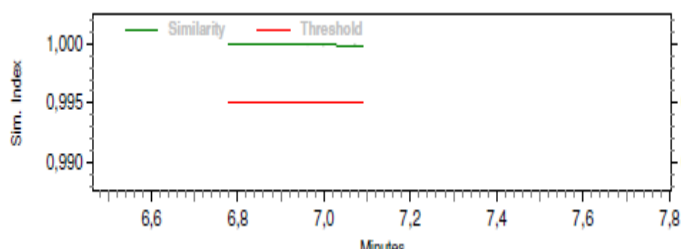
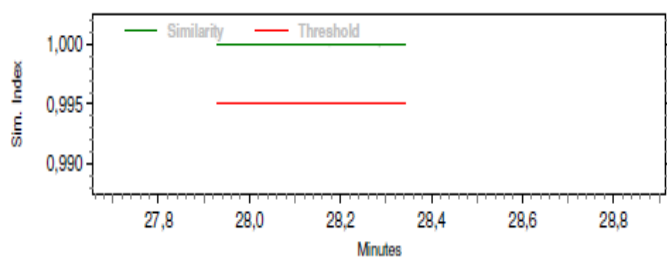


Gráfico 10: Gráficos de pureza e similaridade de picos de lamivudina e zidovudina no estudo de degradação oxidativa (H_2O_2 0,03%) no tempo de 7 dias (matéria-prima). Para a similaridade o padrão é representado em verde e a amostra em azul.

PUREZA DE PICOS – 7 DIAS



Tempo de retenção do pico: 6,9 m
Nome do pico: Lamivudina
Pureza total: 1,000000



Tempo de retenção do pico: 28,08 m
Nome do pico: Lamivudina
Pureza total: 1,000000

SIMILARIDADE DE PICOS – 7 DIAS

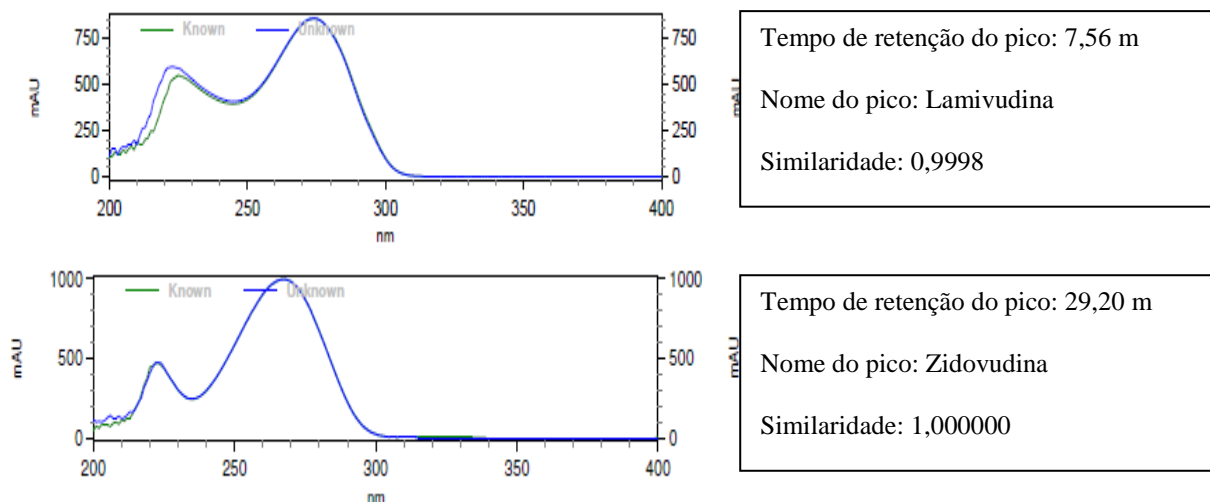


Tabela 15: Áreas e Tempo de Retenção Relativa (TRR) dos picos e teor de lamivudina e zidovudina presentes nas amostras que sofreram oxidação (H_2O_2 0,03%) por tempo de estudo

Tempo de estudo	Tempo de retenção relativo (TRR) dos picos em relação à Lamivudina	Tempo de retenção relativo (TRR) dos picos em relação à Zidovudina	Área dos picos	Área de pico de 3TC	Área de pico de AZT	Teor de 3TC (%)	Teor de AZT (%)
Zero	[1] 0,528	[1] 0,128	75895	28441358	47364578	89,66	92,65
24 Horas	[1] 0,524	[1] 0,128	861442	29376736	50111744	92,61	98,02
48 Horas	[1] 0,528	[1] 0,128	2006335	28844865	51246557	90,93	100,24
72 Horas	[1] 0,518	[1] 0,128	2892052	26612164	49082152	83,90	96,01
7 Dias	[1] 0,523	[1] 0,128	4284561	19248570	39463613	60,68	77,19

H₂O₂ 0,3%

OVERLAY E PERCENTUAL DOS ATIVOS: No tempo zero do estudo foi verificada a presença dos picos de zidovudina e lamivudina com percentual de 97,9% e 94,4%, respectivamente. Neste tempo é observada a presença de dois picos de degradação com [1] TRR 0,095 DEG O1 e área 418884; [2] TRR 0,128 DEG O2 e área 912808, pode-se inferir que os referidos produtos de degradação registrados na forma de pico são advindos da lamivudina, uma vez que em estudos de degradação anteriores com o ativo isolado e nas mesmas condições, foram registrados picos com tempos de retenção relativo semelhantes, ao estudo presente. Após 24 H de estudo, foi evidenciado frente ao padrão comparativo o decaimento de 20,7% da lamivudina, ou seja, dentro do limite aceitável e a zidovudina não apresentou decaimento se comparado ao padrão. Verificou-se que o pico DEG O1 apresentou área 185869 (redução em relação ao tempo zero) e o pico DEG O2 apresentou área 8060108 (crescimento de aproximadamente 9 vezes em relação ao tempo zero). Ainda assim, o presente estudo teve continuação para verificar se havia decaimento da zidovudina o que foi evidenciado no tempo de 7 dias com um decaimento frente ao padrão comparativo de 24,3%, dentro do limite aceitável e a lamivudina neste tempo chegou à 91,2% de degradação. Neste tempo o pico DEG O1 apresentou área 102217 (redução em relação ao tempo zero) e o pico DEG O2 área 19379770 (crescimento de aproximadamente 21 vezes em relação ao tempo zero). Portanto, ambos fármacos sofrem decaimento, como foi observado para a condição de oxidação à 0,03% (H₂O₂), entretanto na concentração de 0,3% (H₂O₂), o decaimento de lamivudina é mais acentuado em um menor espaço de tempo, já a zidovudina mantém praticamente a mesma proporção de decaimento como pode ser visualizado na tabela 16.

ANÁLISE ESPECTRAL: Na análise de pureza de pico tem-se que em 7 dias a zidovudina e a lamivudina apresentaram pureza total, equivalente a 1,000000, como mostra o gráfico 11. Indicando assim, ausência de qualquer outro componente no mesmo pico. Para a análise de similaridade de picos verifica-se que as amostras de lamivudina e a zidovudina possuem picos similares ao padrão, com valor de similaridade 0,9996 e 1,0000.

Figura 11: Overlay dos cromatogramas na condição de degradação por oxidação (H₂O₂ 0,3%) nos tempos zero (preto) e 7 dias (verde)

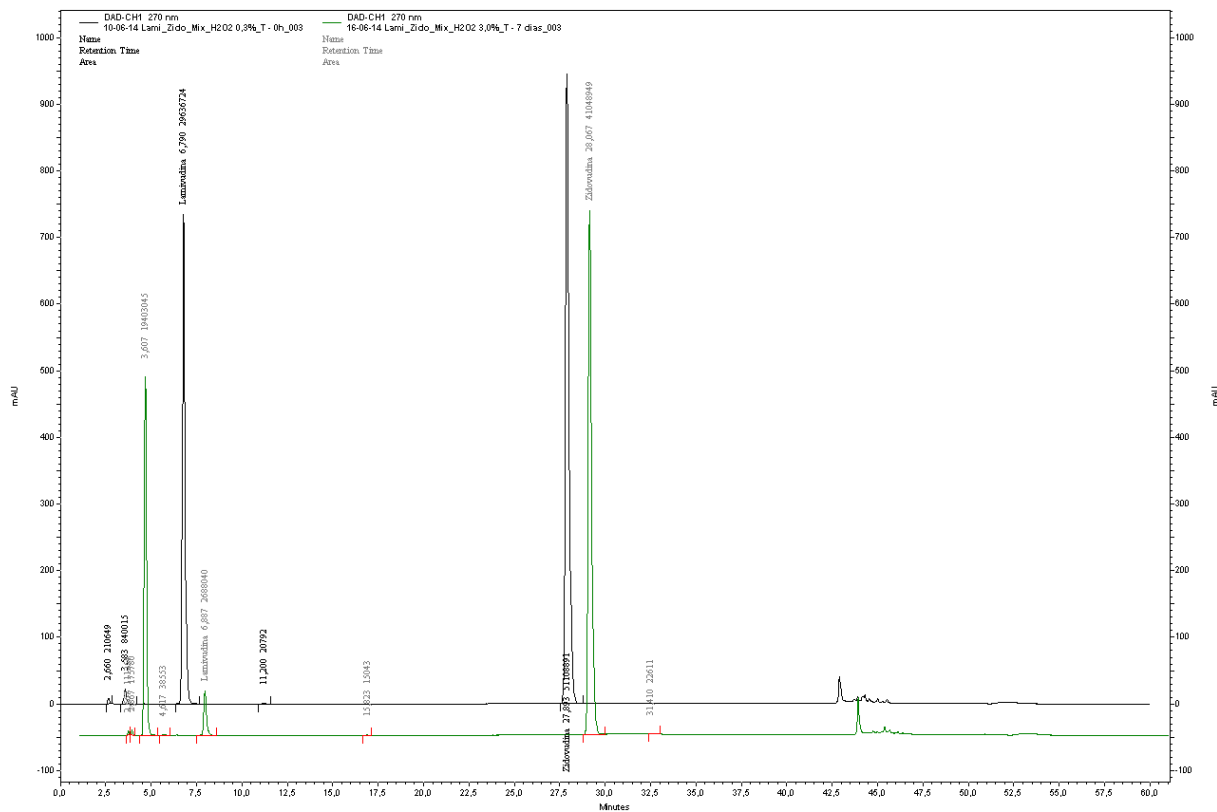
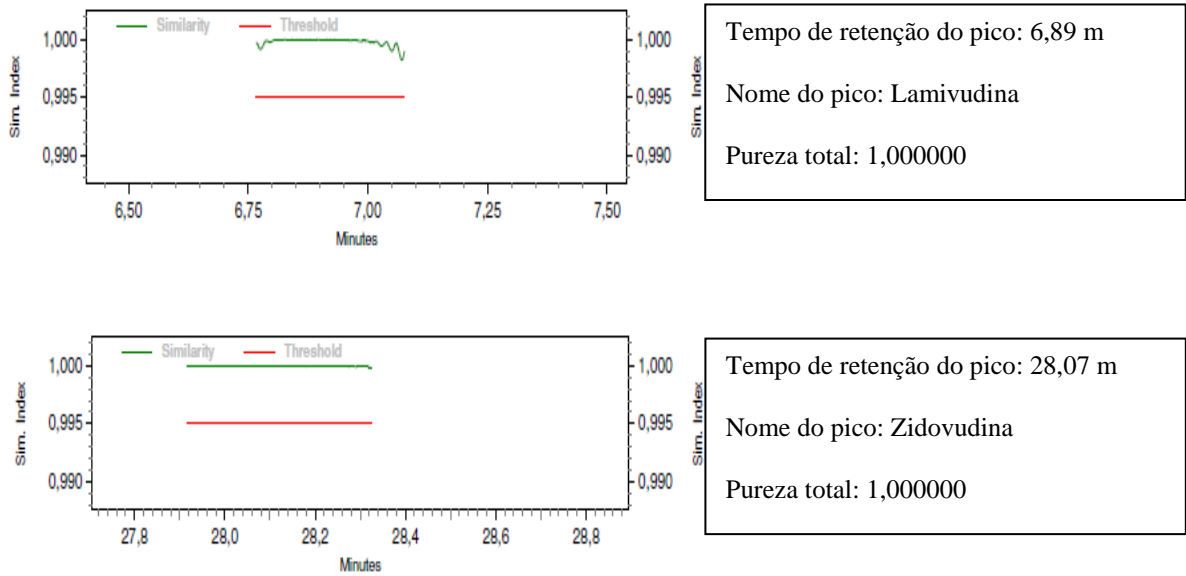
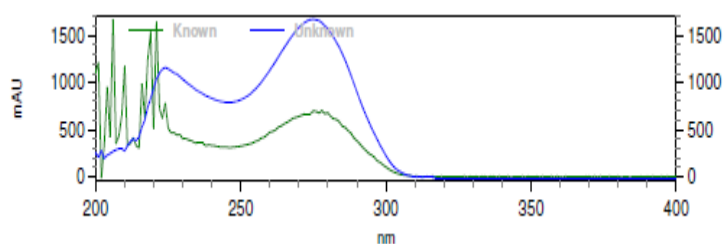


Gráfico 11: Gráficos de pureza e similaridade de picos de lamivudina e zidovudina no estudo de degradação oxidativa (H₂O₂ 0,3%) no tempo de 7 dias (matéria-prima). Para a similaridade o padrão é representado em verde e a amostra em azul.

PUREZA DE PICOS – 7 DIAS



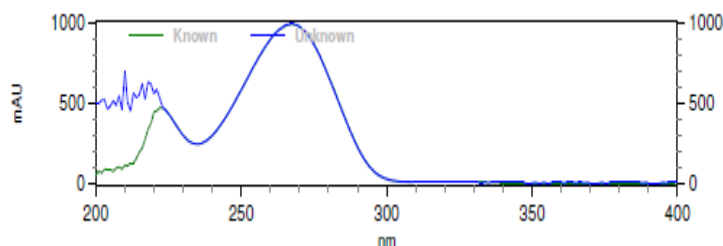
SIMILARDADE DE PICOS – 7 DIAS



Tempo de retenção do pico: 7,58 m

Nome do pico: Lamivudina

Similaridade: 0,9996



Tempo de retenção do pico: 29,05 m

Nome do pico: Zidovudina

Similaridade: 1,0000

Tabela 16: Áreas e Tempo de Retenção Relativa (TRR) dos picos e teor da lamivudina e zidovudina presentes nas amostras que sofrem oxidação (H_2O_2 0,3%) matéria-prima por tempo de estudo

Tempo de estudo	Tempo de retenção relativo (TRR) dos picos em relação à Lamivudina	Tempo de retenção relativo (TRR) dos picos em relação à Zidovudina	Área dos picos	Área de pico de 3TC	Área de pico de AZT	Teor de 3TC (%)	Teor de AZT (%)
Zero	[1] 0,392 [2] 0,527	[1] 0,095 [2] 0,128	418884 912808	51054246	48256140	97,90	94,39
24 Horas	[1] 0,392 [2] 0,529	[1] 0,095 [2] 0,128	185869 8060108	24632853	49090881	77,66	96,02
48 Horas	[1] 0,393 [2] 0,523	[1] 0,095 [2] 0,128	151753 19151616	16986467	49377030	53,55	96,58
72 Horas	[1] 0,385 [2] 0,523	[1] 0,095 [2] 0,129	151753 19151616	10839742	46770836	34,17	91,49
7 Dias	[1] 0,387 [2] 0,524	[1] 0,095 [2] 0,129	102217 19379770	2715857	39463613	8,56	71,43

H₂O₂ 3%

OVERLAY DOS CROMATOGRAMAS E PERCENTUAL DOS ATIVOS: No tempo zero do estudo foi verificada a presença dos picos de zidovudina e lamivudina com percentual de 99,6% e 72,1%, respectivamente. Portanto, no início do estudo a lamivudina já atinge o limite aceitável de degradação. Neste tempo foi observada a presença de dois picos de degradação com [1] TRR 0,095 DEG O1 e área 2234103; [2] TRR 0,128 DEG O2 e área 8074189, pode-se inferir que os referidos produtos de degradação registrados na forma de picos são advindos da lamivudina, uma vez que em estudos de degradação anteriores com o ativo isolado e nas mesmas condições, foi registrado o pico com tempo de retenção relativo semelhante, ao estudo presente, esta justificativa também é válida para zidovudina, quando se infere que um determinado produto de degradação é advindo do ativo. Após 24 horas de estudo, foi evidenciado frente ao padrão analítico o decaimento de 97,4% da lamivudina, ou seja, fora do limite aceitável e a zidovudina não apresentou decaimento se comparado ao padrão. Verificou-se que o pico DEG O1 apresentou área 2364319 (crescimento em relação ao tempo zero) e o pico DEG O2 apresentou área 26742877 (crescimento de aproximadamente 3 vezes em relação ao tempo zero). Neste tempo de estudo, surgiu um produto de degradação no qual podemos inferir que é proveniente de zidovudina com [3] TRR 0,165 DEG O3 e área 22580. Apesar de a lamivudina ter sido praticamente completamente degradada em 24 horas, o presente estudo teve duração de 7 dias, com a finalidade de avaliar se haveria decaimento da zidovudina, o que foi comprovado neste tempo com o ativo degradando 45,87% frente ao padrão comparativo. Também foi evidenciado que o pico [3] DEG O3 registrou (crescimento de área aproximadamente 2 vezes em relação ao tempo zero) e que os picos provenientes da lamivudina DEG O1 e DEG O2 apresentaram redução na sua área, que pode ser justificado devido a formação de produtos de degradação secundários que pela técnica utilizada não foram identificados. Como nas condições oxidativas anteriores, ambos fármacos sofrem decaimento, entretanto na concentração de 3% (H₂O₂), o decaimento de lamivudina é mais acentuado em um menor espaço de tempo, já a zidovudina no tempo de 7 dias teve um decaimento brusco em relação aos tempos anteriores como pode ser visualizado na tabela 17.

ANÁLISE ESPECTRAL: Na análise de pureza de pico tem-se que em 7 dias a zidovudina e a lamivudina apresentaram pureza total, equivalente a 1,000000, como mostra o gráfico 12. Indicando assim, ausência de qualquer outro componente no mesmo pico. Para a análise de similaridade de picos verifica-se que a amostra de lamivudina obteve um valor baixo, igual a

0,9655, em razão da total degradação do ativo e a zidovudina possui pico similar ao padrão, com valor de similaridade 1,000000.

Figura 12: Overlay dos cromatogramas na condição de degradação por (H₂O₂ 3%) oxidação nos tempos zero (preto) e 7 dias (verde)

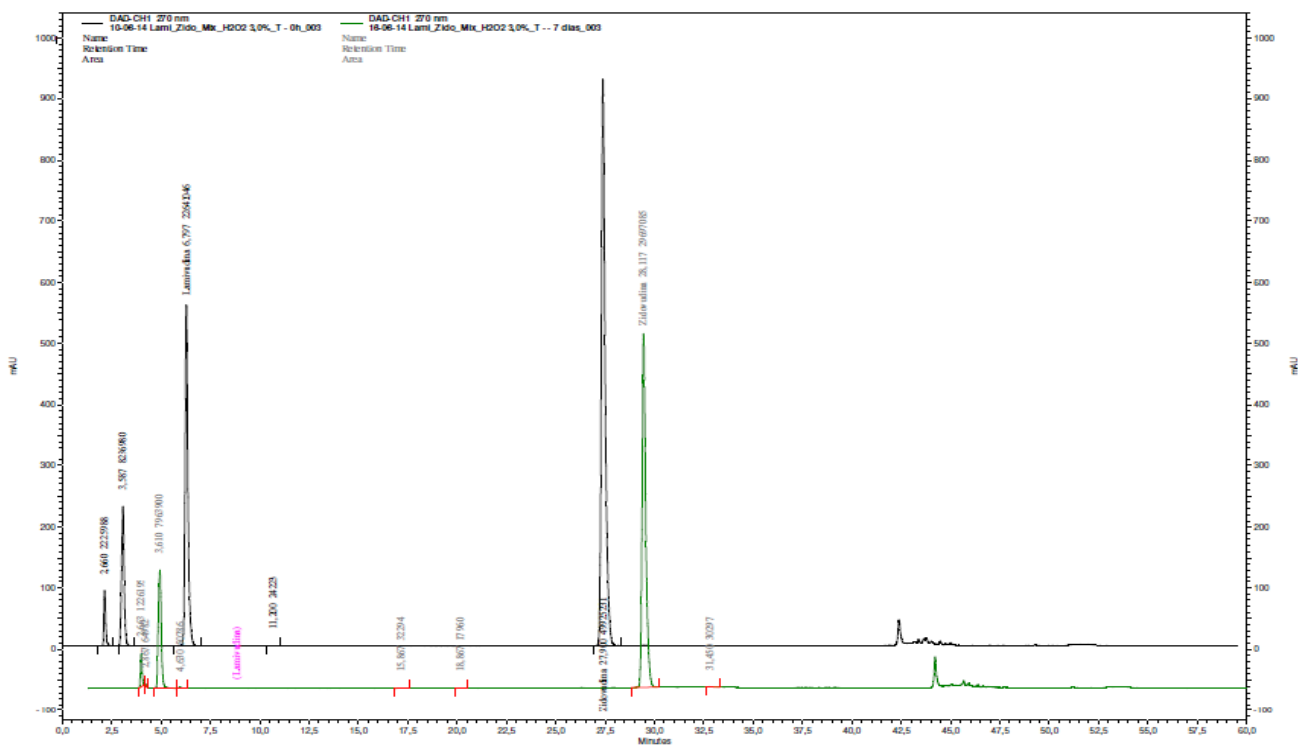
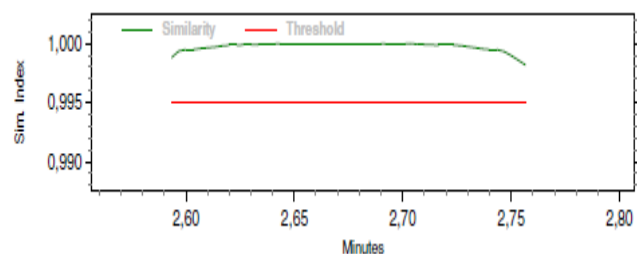


Gráfico 12: Gráficos de pureza e similaridade de picos de lamivudina e zidovudina no estudo de degradação oxidativa (H₂O₂ 3%) no tempo de 7 dias (matéria-prima). Para a similaridade o padrão é representado em verde e a amostra em azul.

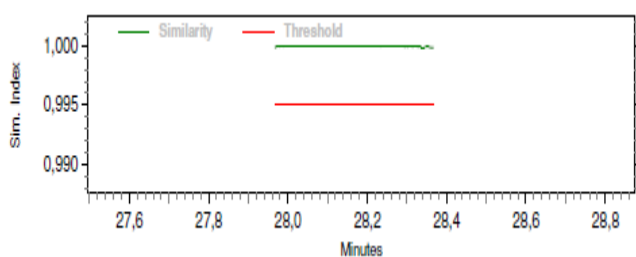
PUREZA DE PICOS – 7 DIAS



Tempo de retenção do pico: 2,66 m

Nome do pico: Lamivudina

Pureza total: 1,000000

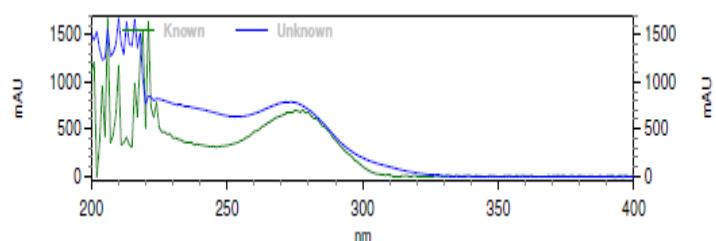


Tempo de retenção do pico: 28,12 m

Nome do pico: Zidovudina

Pureza total: 1,000000

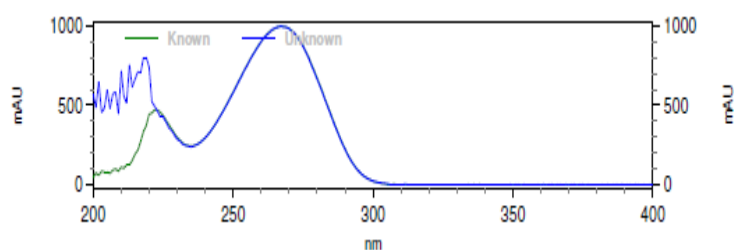
SIMILARIDADE DE PICOS – 7 DIAS



Tempo de retenção do pico: 7,58 m

Nome do pico: Lamivudina

Similaridade: 0,9655



Tempo de retenção do pico: 29,05 m

Nome do pico: Zidovudina

Similaridade: 1,000000

Tabela 17: Áreas e Tempo de Retenção Relativa (TRR) dos picos e teor de lamivudina e zidovudina presentes nas amostras que sofrem oxidação (H_2O_2 3%) matéria-prima por tempo de estudo

Tempo de estudo	Tempo de retenção relativo (TRR) dos picos em relação à Lamivudina	Tempo de retenção relativo (TRR) dos picos em relação à Zidovudina	Área dos picos	Área de pico de 3TC	Área de pico de AZT	Teor de 3TC (%)	Teor de AZT (%)
Zero	[1] 0,392 [2] 0,528	[1] 0,095 [2] 0,128	2234102 8074189	22862948	50933210	72,08	99,63
24 Horas	[1] 0,393 [2] 0,529 -----	[1] 0,095 [2] 0,128 [3] 0,165	2364319 26742877 22580	826465	50993310	2,61	99,75
48 Horas	[1] 0,392 [2] 0,529 -----	[1] 0,095 [2] 0,128 [3] 0,165	1986153 21775277 30255	0	47282524	0,00	92,49
72 Horas	[1] 0,382 [2] 0,518 -----	[1] 0,095 [2] 0,128 [3] 0,165	2094921 19220882 46408	0	48425683	0,00	94,72
7 Dias	[1] 0,383 [2] 0,531 -----	[1] 0,095 [2] 0,128 [3] 0,165	1144693 57646 45499	0	27568416	0,00	53,93

5.2 Comprimidos

5.2.1 Hidrólise ácida

HCL 0,1 M

COLORAÇÃO: Seguiu o mesmo padrão de alteração verificada na matéria-prima.

OVERLAY DOS CROMATOGRAMAS E PERCENTUAL DOS ATIVOS: Foi verificado no tempo zero do estudo a presença dos picos de zidovudina e lamivudina com percentual de 101,64% e 97,54%, respectivamente. Após 72 horas, frente ao padrão comparativo, ambos ativos não apresentaram decaimento e não foi evidenciado o aparecimento de picos de produtos de degradação. Ao final do estudo em 30 dias, os ativos não apresentaram decaimento e houve o surgimento de um pico com [1] TRR 0,350 DEG A1 e área 128219. Conforme estudos anteriores infere-se que este pico represente um produto de degradação advindo da lamivudina. Em análise, verifica-se que ambos fármacos não são susceptíveis a esta condição de degradação.

ANÁLISE ESPECTRAL: Na análise de pureza de pico tem-se que em 30 dias a zidovudina e a lamivudina apresentaram pureza total, equivalente a 1,000000, como mostra o gráfico 13. Indicando assim, ausência de qualquer outro componente no mesmo pico. Para a análise de similaridade de picos verifica-se que as amostras de lamivudina e a zidovudina possuem picos similares ao padrão, com valor de similaridade igual a 0,9999 e 1,0000, respectivamente.

Figura 13: Overlay dos cromatogramas na condição de degradação por hidrólise ácida 0,1M nos tempos zero (verde) e 30 dias (preto)

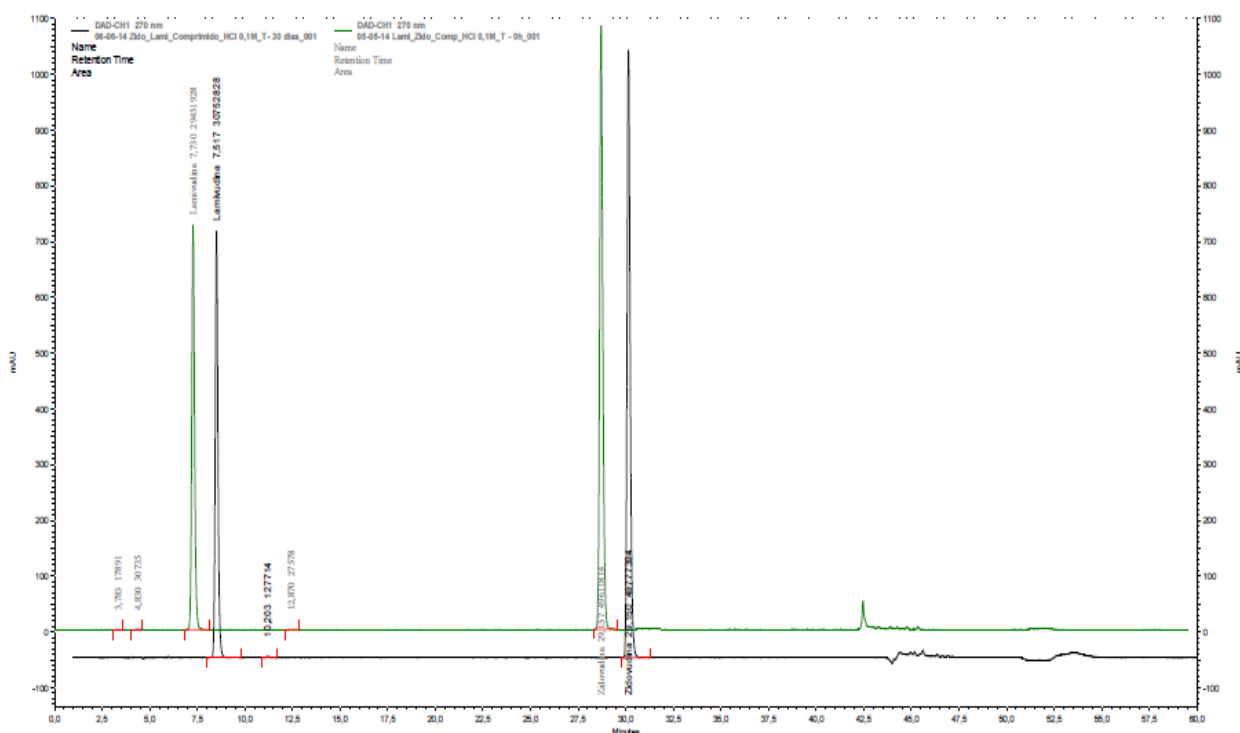
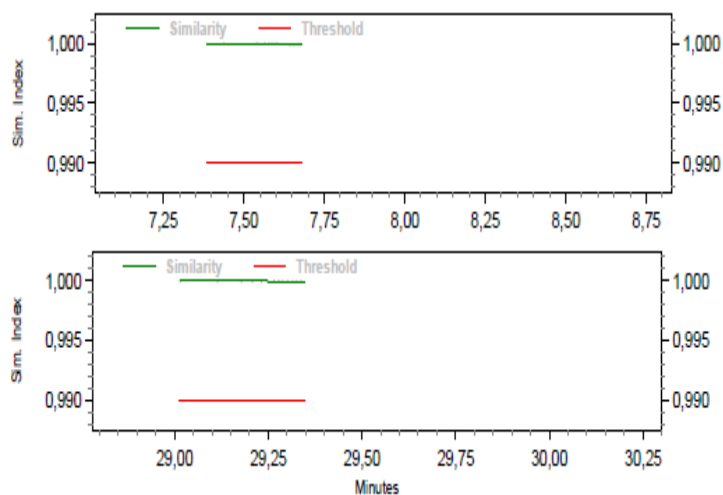


Gráfico 13: Gráficos de pureza e similaridade de picos de lamivudina e zidovudina no estudo de hidrólise ácida HCL 0,1 M no tempo de 30 dias (comprimido). Para a similaridade o padrão é representado em verde e a amostra em azul.

PUREZA DE PICOS – 30 DIAS



Tempo de retenção do pico: 7,52 m

Nome do pico: Lamivudina

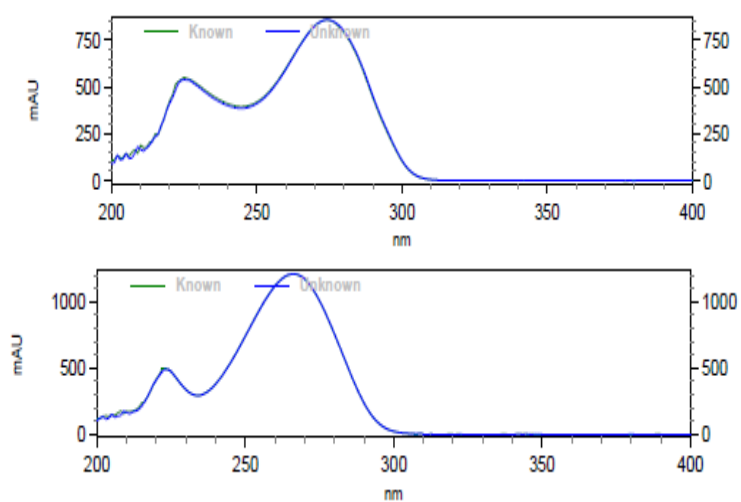
Pureza total: 1,000000

Tempo de retenção do pico: 29,15 m

Nome do pico: Zidovudina

Pureza total: 1,000000

SIMILARIDADE DE PICOS – 30 DIAS



Tempo de retenção do pico: 7,56 m

Nome do pico: Lamivudina

Similaridade: 0,9999

Tempo de retenção do pico: 29,20 m

Nome do pico: Zidovudina

Similaridade: 1,0000

Tabela 18: Áreas e Tempo de Retenção Relativa (TRR) dos picos e teor de lamivudina e zidovudina presentes nas amostras que sofreram hidrólise ácida 0,1 M (comprimido) por tempo de estudo

Tempo de estudo	Tempo de retenção relativo (TRR) dos picos em relação à Lamivudina	Tempo de retenção relativo (TRR) dos picos em relação à Zidovudina	Área dos picos	Área de pico de 3TC	Área de pico de AZT	Teor de 3TC (%)	Teor de AZT (%)
Zero	-----	-----	-----	30303357	50831573	97,54	101,64
24 horas	-----	-----	-----	29349882	49868150	94,47	99,71
48 horas	-----	-----	-----	29327031	49555725	94,39	99,09
72 horas	-----	-----	-----	30043171	51067428	96,70	102,11
10 dias	-----	-----	-----	30364066	49668095	97,73	99,31
30 dias	[1] 1,357	[1] 0,350	128219	30944986	50053517	99,60	100,09

*OBS: Devido a questões técnicas e analíticas, realizamos o estudo no 10º dia, ao invés do 7º dia; como foram realizados os estudos anteriores e não foi realizada a análise do 15º dia, em virtude da mesma questão.

HCL 1,0 M

OVERLAY DOS CROMATOGRAMAS E PERCENTUAL DOS ATIVOS: Foi verificado no tempo zero de estudo a presença dos picos de zidovudina e lamivudina com percentual de 101,41% e 97,5%, respectivamente. Neste tempo, foi observada a presença de um pico com [1] TRR 0,167 DEG A1 e área 32755. Após 10 dias, frente ao padrão comparativo, não houve decaimento de ambos ativos, além disso, surgiu um pico novo com [2] TRR 0,103 DEG A2 e área 205305 e o pico de DEG A1 apresentou crescimento de área (5x), em relação ao tempo inicial. Finalizando o estudo em 30 dias, foi observado que a zidovudina e a lamivudina não apresentaram decaimento. Não houve o surgimento de picos novos, além disso, tiveram aumento as áreas dos picos de DEG A1 (16x) e DEG A2 (3x), em relação ao tempo inicial que foram encontrados. Conforme, estudos anteriores pode-se inferir que o pico de DEG A1 representa um produto de degradação proveniente da zidovudina, assim como DEG A2, provém da lamivudina. Em análise, verifica-se que ambos fármacos não são susceptíveis a esta condição de degradação.

ANÁLISE ESPECTRAL: Na análise de pureza de pico tem-se que em 30 dias a zidovudina e a lamivudina apresentaram pureza total, equivalente a 1,000000, como mostra o gráfico 14. Indicando assim, ausência de qualquer outro componente no mesmo pico. Para a análise de similaridade de picos verifica-se que as amostras de lamivudina e a zidovudina possuem picos similares ao padrão, com valor de similaridade igual a 0,9999 e 1,0000, respectivamente.

Figura 14: Overlay dos cromatogramas na condição de degradação por hidrólise ácida 1,0 M nos tempos zero (verde) e 30 dias preto

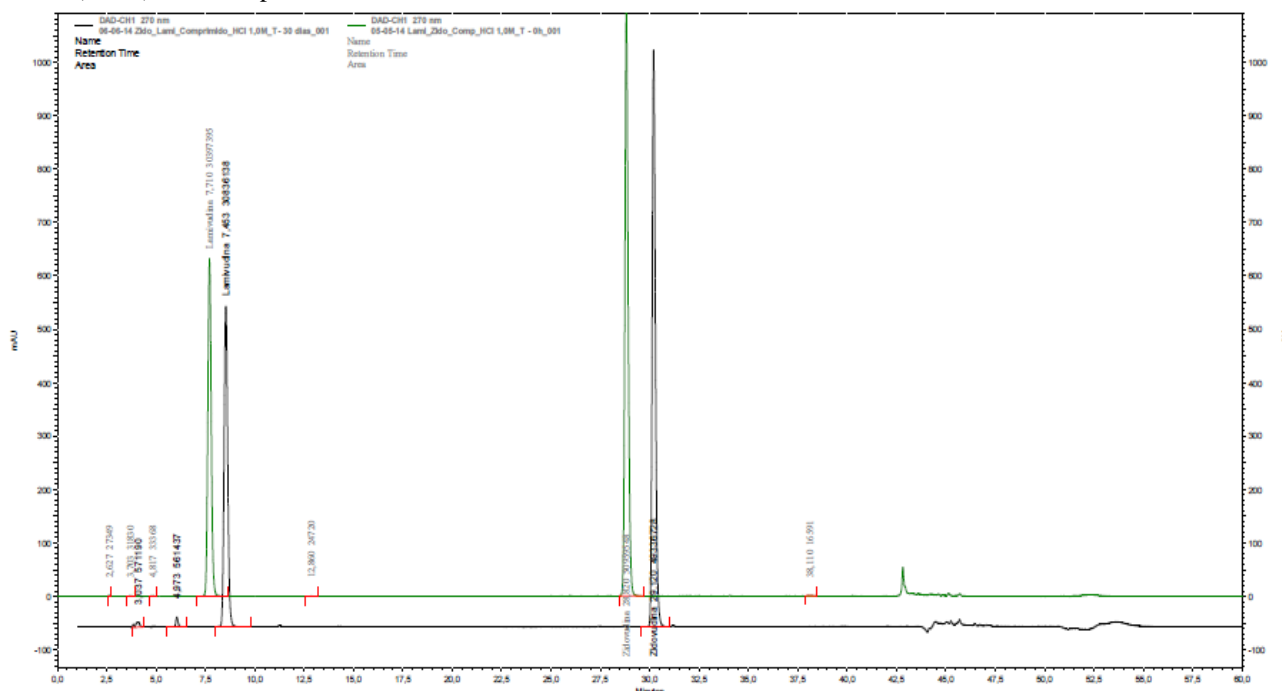
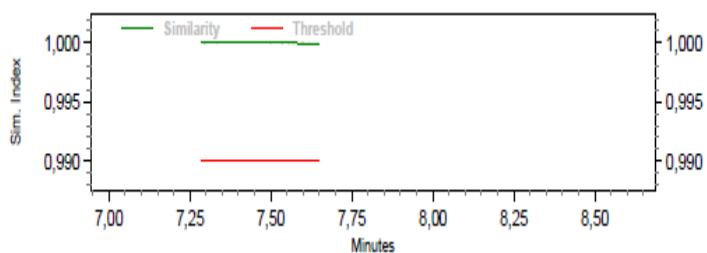


Gráfico 14: Gráficos de pureza e similaridade de picos de lamivudina e zidovudina no estudo de hidrólise ácida 1,0 M no tempo de 30 dias (comprimido). Para a similaridade o padrão é representado em verde e a amostra em azul.

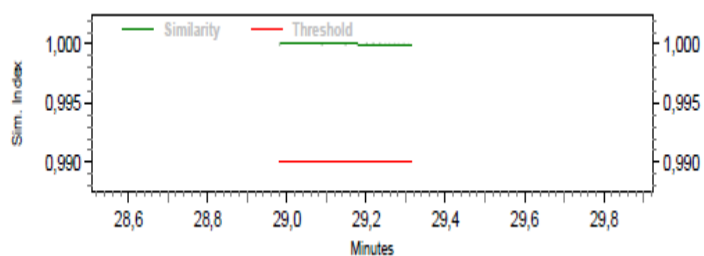
PUREZA DE PICOS- 30 DIAS



Tempo de retenção do pico: 7,45 m

Nome do pico: Lamivudina

Pureza total: 1,000000

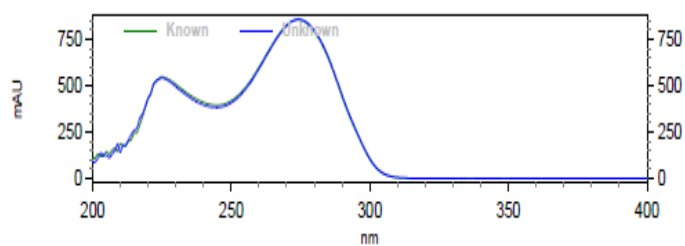


Tempo de retenção do pico: 29,12 m

Nome do pico: Zidovudina

Pureza total: 1,000000

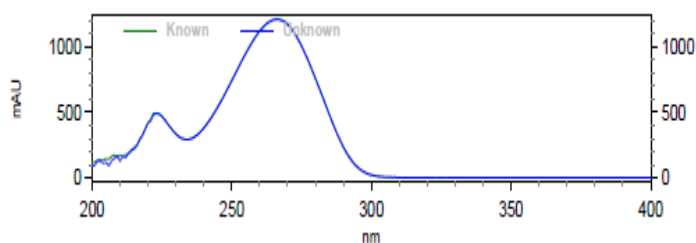
SIMILARIDADE DE PICOS – 30 DIAS



Tempo de retenção do pico: 7,56 m

Nome do pico: Lamivudina

Similaridade: 0,9999



Tempo de retenção do pico: 29,20 m

Nome do pico: Zidovudina

Similaridade: 1,0000

Tabela 19: Áreas e Tempo de Retenção Relativa (TRR) dos picos e teor de lamivudina e zidovudina presentes nas amostras que sofreram hidrólise ácida 1,0 M (comprimido) por tempo de estudo

Tempo de estudo	Tempo de retenção relativo (TRR) dos picos em relação à Lamivudina	Tempo de retenção relativo (TRR) dos picos em relação à Zidovudina	Área dos picos	Área de pico de 3TC	Área de pico de AZT	Teor de 3TC (%)	Teor de AZT (%)
Zero	-----	[1] 0,167	32755	30295327	50718038	97,51	101,41
24 horas	-----	[1] 0,166	55494	29623037	49629036	95,35	99,24
48 horas	-----	[1] 0,169	71000	29346143	49397177	94,46	98,77
72 horas	-----	[1] 0,166	87809	29532413	49531077	95,05	99,04
10 Dias	-----	[1] 0,171	190242	30183887	48996860	97,15	97,42
	[2] 0,384	[2] 0,103	205305				
30 Dias	-----	[1] 0,171	560050	30589427	49028272	98,46	98,03
	[2] 0,407	[2] 0,103	572593				

*OBS: Devido a questões técnicas e analíticas, realizamos o estudo no 10º dia, ao invés do 7º dia; como foram realizados os estudos anteriores e não foi realizada a análise do 15º dia, em virtude da mesma questão.

HCL 5M

OVERLAY DOS CROMATOGRAMAS E PERCENTUAL DOS ATIVOS: Foi verificado no tempo zero do estudo a presença dos picos de zidovudina e lamivudina com percentual de 98,3% e 97%, respectivamente. Neste tempo, surgiu um pico com [1] TRR 0,096 DEG A1 e área 654966. Após 24 horas, surgiram três picos novos com [2] TRR 0,171 DEG A2 e área 747186; [3] TRR 0,910 DEG A3 e área 156307; [4] TRR 1,032 e área 755095, além disso o pico de DEG A1, teve aumento de área (2x) em relação ao tempo zero. Em 48 horas houve aumento de área dos picos de DEG A1(3x), A2, A3 e A4 aproximadamente (2x), cada um. Também houve o surgimento de um pico novo com [5] TRR 0,785 DEG A5 e área 162296. Após 72 horas, houve crescimento de todos os picos de degradação encontrados e o surgimento de um pico novo de degradação com [6] TRR 0,459 DEG A6 e área 166651. Em 7 dias os ativos zidovudina e lamivudina apresentaram um decaimento de 18,1% e 10,8%, respectivamente. Não surgiram picos novos de degradação e todos os outros encontrados tiveram aumento de área. Em 15 dias, a zidovudina apresentou decaimento de 41,2%, ou seja, fora do limite aceitável e a lamivudina atingiu 15% de degradação. Os picos de DEG A1, A2, A3, A4 e A5 tiveram aumento de área, já o pico de DEG A6 não foi registrado, houve o surgimento de um pico novo com [7] TRR 0,127 e área 227061. Finalizando o estudo em 30 dias, a zidovudina apresentou decaimento de 59,7% e a lamivudina 43,7%. Houve crescimento de área nos picos de DEG A1 (19x), A2 (17x), A3 (17x), A4 (12x), A5 (13x), A7(1,2x) em relação ao tempo inicial que foram encontrados. O pico de DEG A6, como no tempo anterior, não foi registrado e surgiu um novo pico com [8] TRR 0,301 DEG A8 e área 267932. Como em condições anteriores, foi possível inferir que os picos de DEG A2, A3, A4, A5, A6, A7 são produtos de degradação provenientes da zidovudina e os picos de DEG A1 e DEG A8, possuem origem desconhecida. Foi comprovado que ambos fármacos são susceptíveis as condições de degradação.

ANÁLISE ESPECTRAL: Na análise de pureza de pico tem-se que em 15 dias a zidovudina e a lamivudina apresentaram pureza total, equivalente a 1,000000, como mostra o gráfico 15. Indicando assim, ausência de qualquer outro componente no mesmo pico. Para a análise de similaridade de picos verifica-se que as amostras de lamivudina e a zidovudina possuem picos similares ao padrão, com valor de similaridade igual a 1,0000.

Figura 15: Overlay dos cromatogramas na condição de degradação por hidrólise ácida 5,0 M nos tempos zero (verde) e 15 dias (preto)

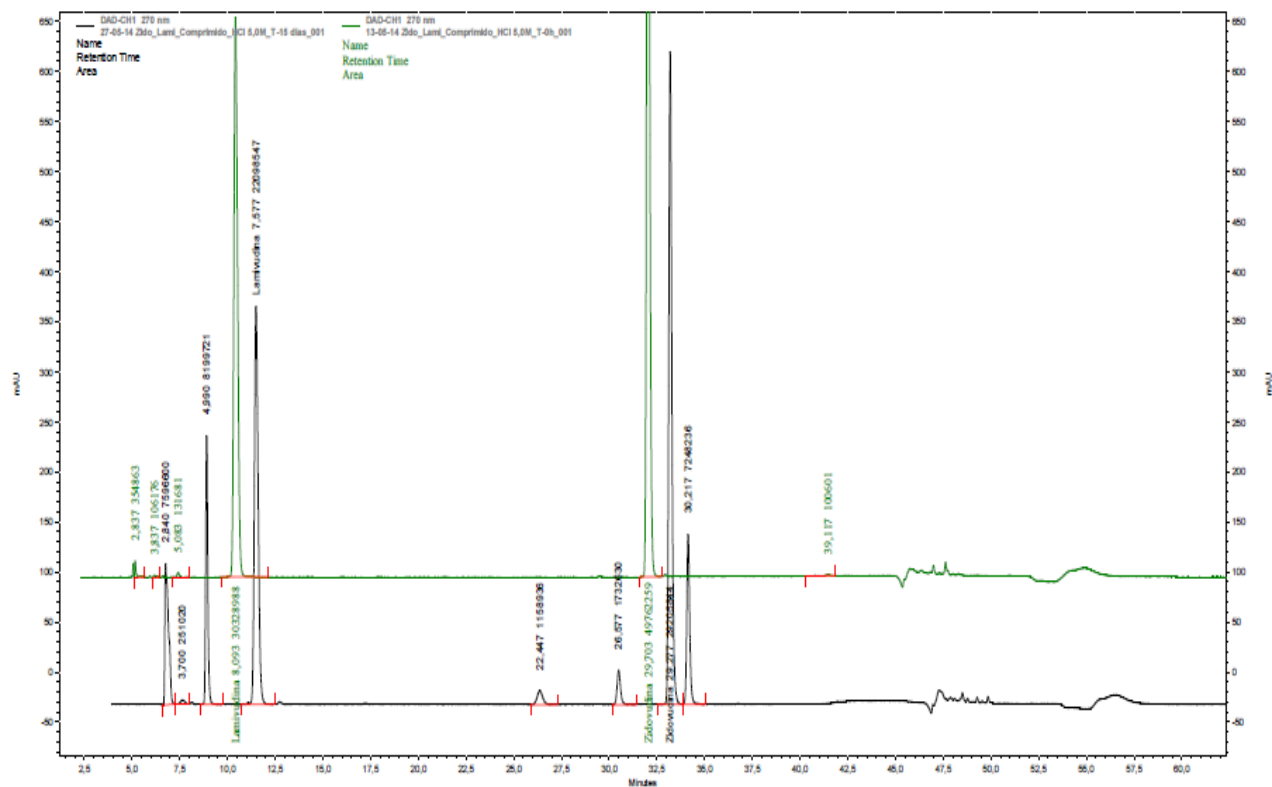
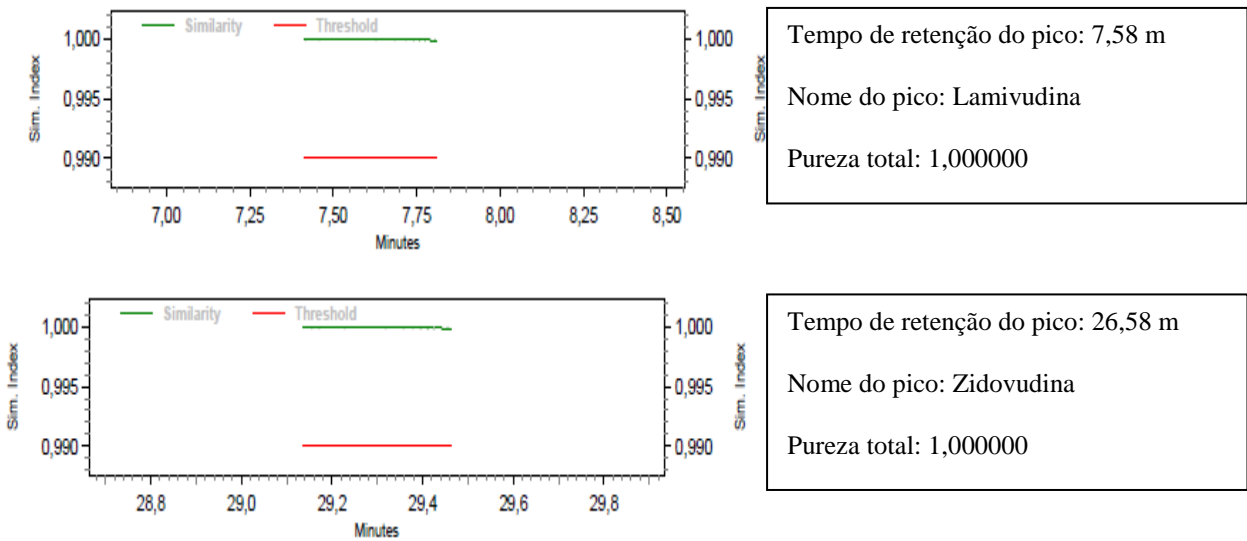
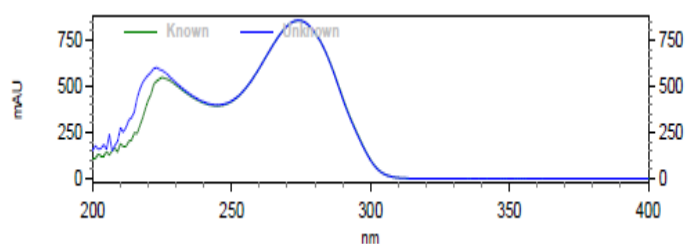


Gráfico 15: Gráficos de pureza e similaridade de picos de lamivudina e zidovudina no estudo de hidrólise ácida 5,0 M no tempo de 15 dias (comprimido). Para a similaridade o padrão é representado em verde e a amostra em azul.

PUREZA DE PICOS – 15 DIAS



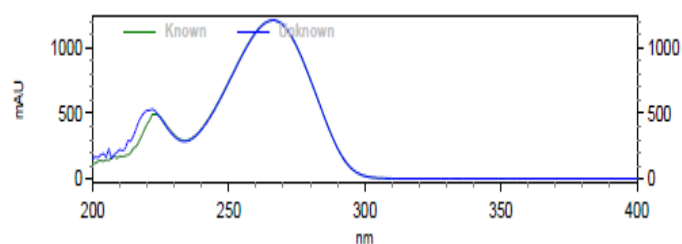
SIMILARIDADE DE PICOS – 15 DIAS



Tempo de retenção do pico: 7,56 m

Nome do pico: Lamivudina

Similaridade: 1,000000



Tempo de retenção do pico: 29,20 m

Nome do pico: Zidovudina

Similaridade: 1,000000

Tabela 20: Áreas e Tempo de Retenção Relativa (TRR) dos picos e teor de lamivudina e zidovudina presentes nas amostras que sofreram hidrólise ácida 5,0 M (comprimido) por tempo de estudo

Tempo de estudo	Tempo de retenção relativo (TRR)	Área dos picos
Zero	[1] 0,096	654966
24 horas	[1] 0,096	1338641
48 horas	[1] 0,096	1887852
72 horas	[1] 0,096	2338468
7 Dias	[1] 0,096	3558775
15 Dias	[1] 0,097	7655345
	[2] 0,127	227061
30 Dias	[1] 0,098	12269169
	[2] 0,126	267185

Tabela 21: Áreas e Tempo de Retenção Relativa (TRR) dos picos e teor de lamivudina e zidovudina presentes nas amostras que sofreram hidrólise ácida 5,0 M (comprimido) por tempo de estudo

Tempo de estudo	Tempo de retenção relativo (TRR) dos picos em relação à Lamivudina	Tempo de retenção relativo (TRR) dos picos em relação à Zidovudina	Área dos picos	Área de pico de 3TC	Área de pico de AZT	Teor de 3TC (%)	Teor de AZT (%)
Zero	-----	-----	-----	30133993	49165965	96,99	98,31
24 horas	----- ----- -----	[2] 0,171 [3] 0,910 [4] 1,032	747186 156307 755095	29808595	4700755	95,94	95,14
48 horas	----- ----- ----- -----	[2] 0,171 [3] 0,913 [4] 1,031 [5] 0,785	1359813 293726 1412692 162296	29048847	46278023	97,48	92,54
72 horas	----- ----- ----- ----- -----	[2] 0,171 [3] 0,913 [4] 1,031 [5] 0,784 [6] 0,459	1917570 290733 1998051 235706 166651	28273076	44098910	98,44	88,18
7 Dias	----- ----- ----- ----- -----	[2] 0,171 [3] 0,910 [4] 1,032 [5] 0,775 [6] 0,457	3535257 761837 3591962 450561 169154	26890038	40265956	86,55	80,51
15 Dias	----- ----- ----- -----	[2] 0,171 [3] 0,908 [4] 1,032 [5] 0,766	8268803 1746745 7303254 1173034	21846488	28911310	82,40	57,81
30 Dias	----- ----- ----- ----- -----	[2] 0,171 [3] 0,904 [4] 1,033 [5] 0,756 [8] 0,301	12768962 2611679 9283625 1996458 267932	17121376	19812022	55,11	39,62

5.2.2 Hidrólise alcalina

NAOH 0,1 M

COLORAÇÃO: Seguiu o mesmo padrão relatado para nas amostras de matéria-prima.

OVERLAY DOS CROMATOGRAMAS E PERCENTUAL DOS ATIVOS: Foi verificado no tempo zero do estudo a presença dos picos de zidovudina e lamivudina com percentual de 99,2% e 94,8%, respectivamente. Neste tempo foi observada a presença dos picos com [1] TRR 0,130 DEG B1 e área 22185; [2] TRR 0,166 DEG B2 e área 20411. Em 24 horas, frente ao padrão comparativo, a zidovudina e a lamivudina permaneceram sem decaimento. Os picos registrados anteriormente tiveram aumento de área e houve o surgimento de dois picos com [3] TRR 0,101 DEG B3 e área 16804; [4] TRR 0,343 DEG B4 e área 23028. Em 30 dias, a zidovudina permaneceu sem decaimento e a lamivudina decaiu 6%. Não houve o surgimento de picos novos, além disso tiveram aumento as áreas dos picos de DEG B1(9x), B3 (60x) e B4 (13x) em relação ao tempo inicial que foram registrados, já o pico de DEG B2 não foi verificado. Conforme em condições anteriores, pode-se inferir que todos os picos registrados são produtos de degradação provenientes da lamivudina. Em análise, verifica-se que ambos fármacos não são susceptíveis a esta condição de degradação.

ANÁLISE ESPECTRAL: Na análise de pureza de pico tem-se que em 30 dias a zidovudina e a lamivudina apresentaram pureza total, equivalente a 1,000000, como mostra o gráfico 16. Indicando assim, ausência de qualquer outro componente no mesmo pico. Para a análise de similaridade de picos verifica-se que as amostras de lamivudina e a zidovudina possuem picos similares ao padrão, com valor de similaridade igual a 0,9999 e 1,0000, respectivamente.

Figura 16: Overlay dos cromatogramas na condição de hidrólise básica 0,1 M nos tempos zero (verde) e 30 dias (preto)

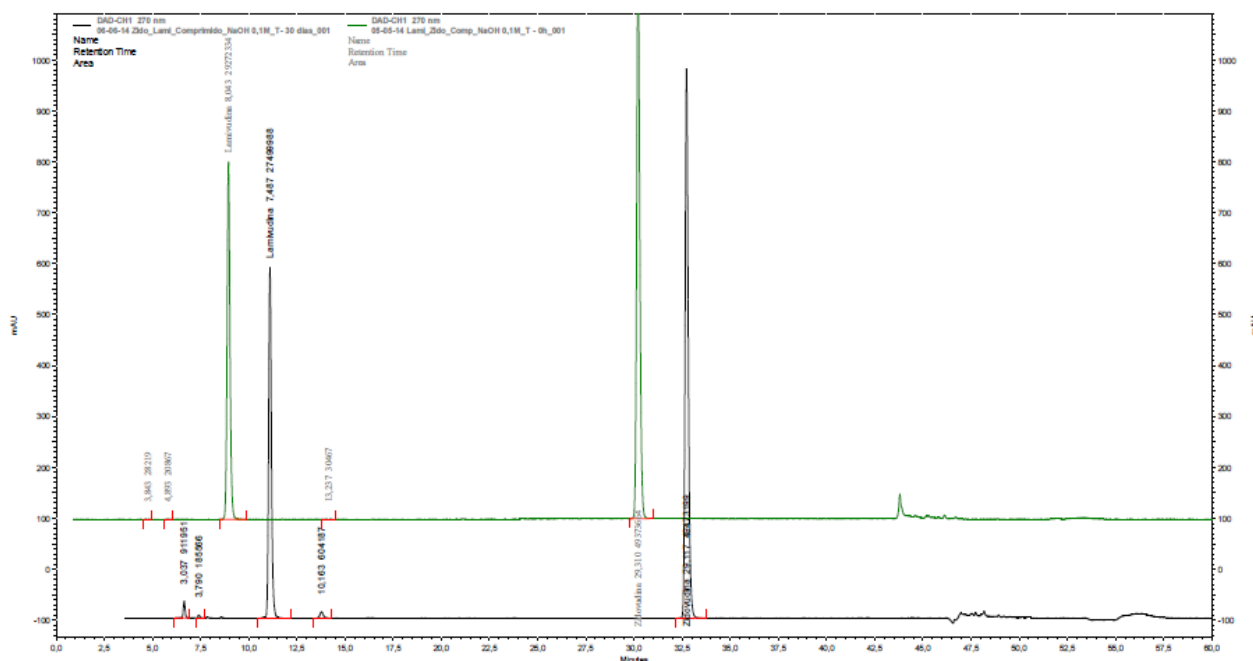
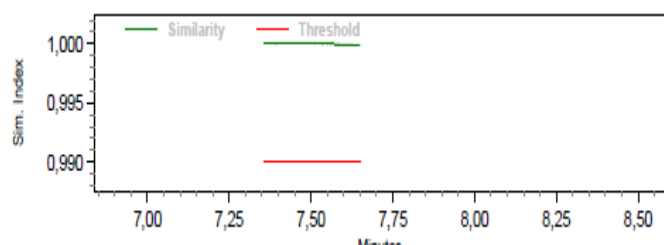


Gráfico 16: Gráficos de pureza e similaridade de picos de lamivudina e zidovudina no estudo de hidrólise básica 0,1 M no tempo de 30 dias (comprimido). Para a similaridade o padrão é representado em verde e a amostra em azul.

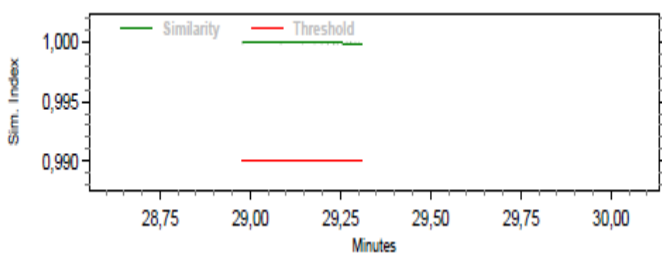
PUREZA DE PICOS – 30 DIAS



Tempo de retenção do pico: 7,49 m

Nome do pico: Lamivudina

Pureza total: 1,000000

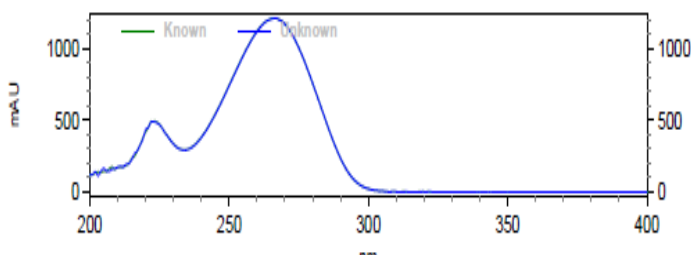


Tempo de retenção do pico: 29,12 m

Nome do pico: Zidovudina

Pureza total: 1,000000

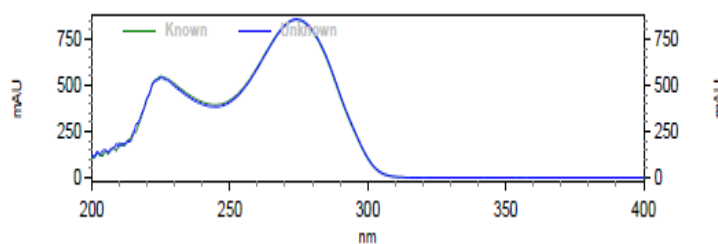
SIMILARIDADE DE PICOS – 30 DIAS



Tempo de retenção do pico: 7,56 m

Nome do pico: Lamivudina

Similaridade: 0,9999



Tempo de retenção do pico: 29,20 m

Nome do pico: Zidovudina

Similaridade: 1,0000

Tabela 22: Áreas e Tempo de Retenção Relativa (TRR) dos picos e teor de lamivudina e zidovudina nas amostras que sofreram hidrólise básica 0,1 M (comprimido) por tempo de estudo

Tempo de estudo	Tempo de retenção relativo (TRR) dos picos em relação à Lamivudina	Tempo de retenção relativo (TRR) dos picos em relação à Zidovudina	Área dos picos	Área de pico de 3TC	Área de pico de AZT	Teor de 3TC (%)	Teor de AZT (%)
Zero	[1] 0,485 [2] 0,619	[1] 0,130 [2] 0,166	22185 20411	29453315	49602280	94,80	99,18
24 horas	[1] 0,489 [2] 0,635 [3] 0,388 [4] 1,311	[1] 0,128 [2] 0,166 [3] 0,101 [4] 0,343	30070 21746 16804 23028	29568994	50221495	95,17	100,42
48 horas	[1] 0,474 [2] 0,617 [3] 0,370 [4] 1,321	[1] 0,129 [2] 0,166 [3] 0,100 [4] 0,356	55380 23666 28806 42741	29449215	49957877	94,79	99,89
72 horas	[1] 0,485 [2] 0,627 [3] 0,383 [4] 1,305	[1] 0,128 [2] 0,165 [3] 0,101 [4] 0,344	68002 22981 40580 59944	29418134	50303251	94,69	100,58
10 Dias	[1] 0,485 [3] 0,382 [4] 1,326	[1] 0,132 [3] 0,103 [4] 0,359	211362 217379 201098	30243783	50907792	97,34	101,79
15 Dias	[1] 0,481 [3] 0,379 [4] 1,327	[1] 0,132 [3] 0,103 [4] 0,363	242960 353084 287682	29230299	50024074	94,08	100,03
30 Dias	[1] 0,506 [3] 0,406 [4] 1,357	[1] 0,130 [3] 0,104 [4] 0,349	195253 928418 610526	27724030	48883994	89,23	97,75

NAOH 1M

OVERLAY DOS CROMATOGRAMAS E PERCENTUAL DOS ATIVOS: Foi verificado no tempo zero do estudo a presença dos picos de zidovudina e lamivudina com percentual de 98,9% e 93,6%, respectivamente. Neste tempo foram registrados os picos com [1] TRR 0,100 DEG B1 e área 40088; [2] TRR 0,165 DEG B2 e área 20835; [3] TRR 0,351 DEG B3 e área 75087. Após 72 horas, frente ao padrão comparativo a zidovudina permaneceu sem decaimento e a lamivudina decaiu 21,2%. Não surgiram picos novos e tiveram aumento de área os picos de DEG B1(20x), B2(9x) e B3 (23x) em relação ao tempo zero. Em 10 dias, não houve decaimento da zidovudina e a lamivudina atingiu decaiu 59%, ou seja, fora do limite aceitável. Os picos de degradação anteriormente registrados tiveram aumento de área e surgiu um pico novo com [4] TRR 0,088 DEG B4 e área 204102. Em 15 dias, a zidovudina não apresentou decaimento, enquanto que a lamivudina apresentou decaimento de 73%. Todos os picos anteriormente encontrados tiveram aumento de área e surgiram dois picos novos com [5] TRR 0,116 e área 182405; [6] TRR 0,171 e área 220303. Ao final do estudo em 30 dias, a zidovudina permaneceu sem decaimento e a lamivudina foi praticamente totalmente degradada, além disso tiveram aumento de área os picos de DEG B1(102x), B2 (53x), B3 (81x), B4 (2x), B5 (3x) e B6 (2x) em relação ao tempo inicial que foram encontrados. Como em condições anteriores, pode-se inferir que os picos de DEG B1, B2, B3 e B5 são produtos de degradação provenientes da lamivudina, assim como o pico de DEG B4 tem origem desconhecida e o pico de DEG B6 é um produto advindo da zidovudina. Foi comprovado que apenas a lamivudina é susceptível as condições de degradação.

ANÁLISE ESPECTRAL: Na análise de pureza de pico tem-se que em 30 dias a zidovudina e a lamivudina apresentaram pureza total, equivalente a 1,000000, como mostra o gráfico 17. Indicando assim, ausência de qualquer outro componente no mesmo pico. Para a análise de similaridade de picos verifica-se que as amostras de lamivudina e a zidovudina possuem picos similares ao padrão, com valor de similaridade igual a 0,9998 e 1,0000, respectivamente.

Figura 17: Overlay dos cromatogramas na condição de hidrólise básica 1,0 M nos tempos zero (verde) e 30 dias (preto)

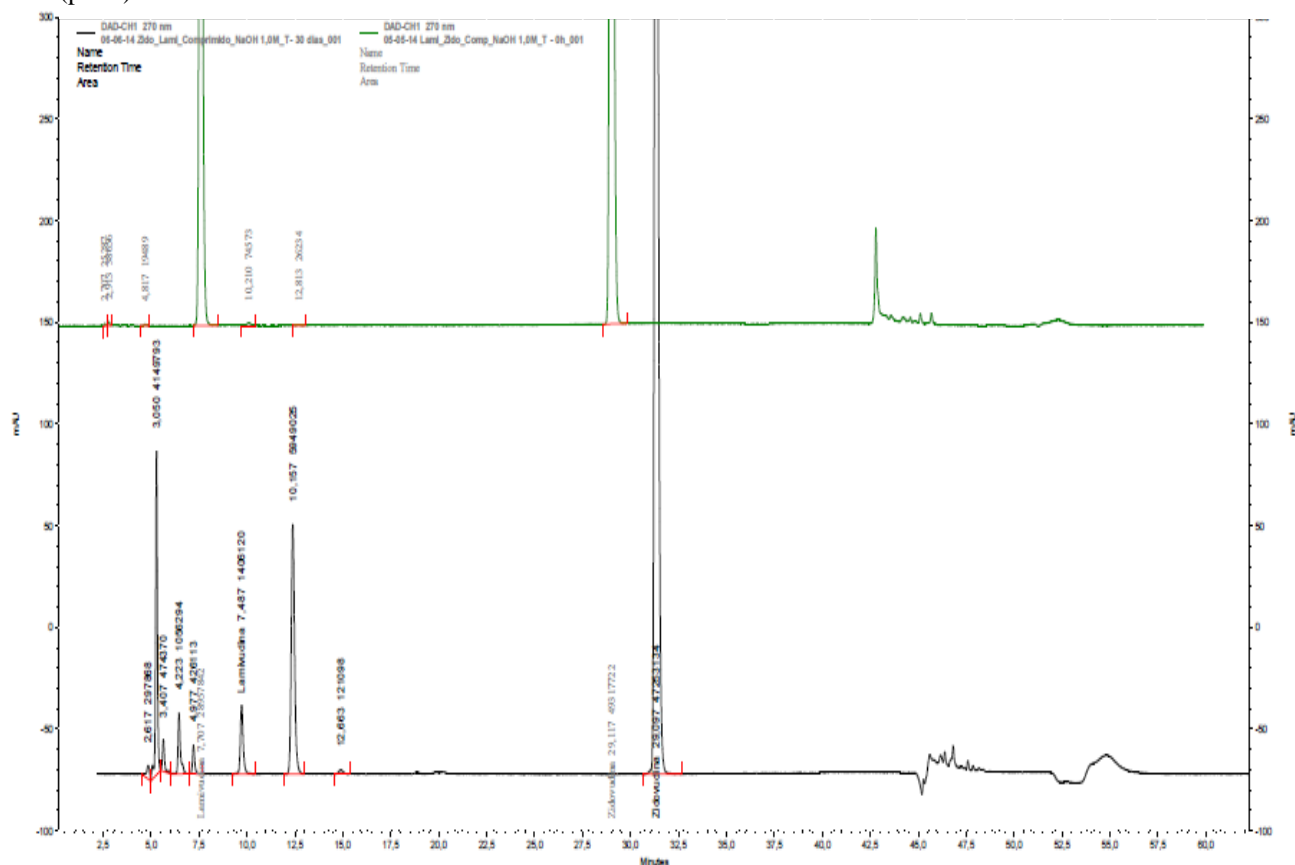
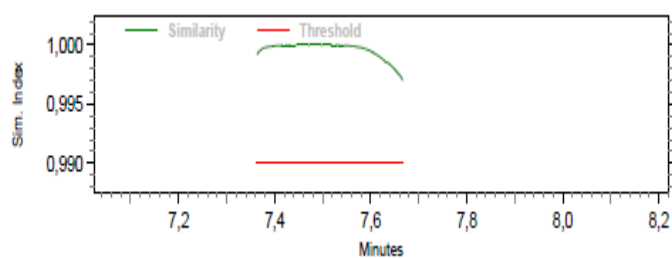


Gráfico 17: Gráficos de pureza e similaridade de picos de lamivudina e zidovudina no estudo de hidrólise básica 1,0 M no tempo de 30 dias (comprimido). Para a similaridade o padrão é representado em verde e a amostra em azul.

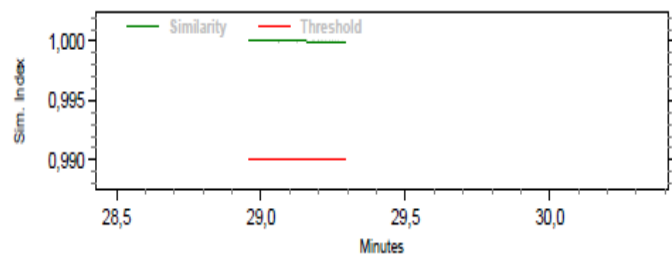
PUREZA DE PICOS – 30 DIAS



Tempo de retenção do pico: 7,49 m

Nome do pico: Lamivudina

Pureza total: 1,000000

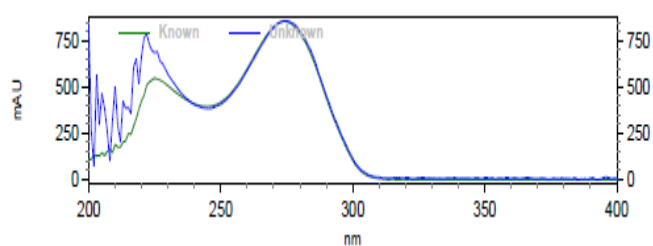


Tempo de retenção do pico: 29,10 m

Nome do pico: Zidovudina

Pureza total: 1,000000

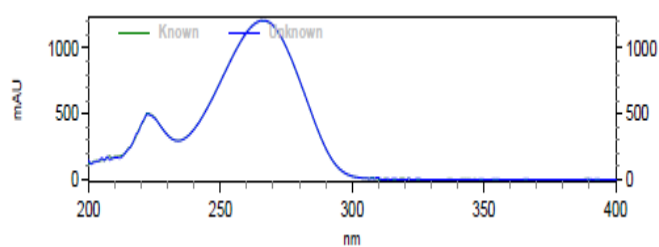
SIMILARIDADE DE PICOS – 30 DIAS



Tempo de retenção do pico: 7,56 m

Nome do pico: Lamivudina

Similaridade: 0,9998



Tempo de retenção do pico: 29,20 m

Nome do pico: Zidovudina

Similaridade: 1,000000

Tabela 23: Áreas e Tempo de Retenção Relativa (TRR) dos picos de origem desconhecida nas amostras de hidrólise básica 1,0 M (comprimido) por tempo de estudo

Tempo de estudo	Tempo de retenção relativo (TRR)	Área dos picos
Zero	-----	-----
24 horas	-----	-----
48 horas	-----	-----
72 horas	-----	-----
10 Dias	[4] 0,088	204102
15 Dias	[4] 0,088	230656
30 Dias	[4] 0,090	291921

Tabela 24: Áreas e Tempo de Retenção Relativa (TRR) dos picos e teor de lamivudina e zidovudina presentes nas amostras que sofreram hidrólise básica 1,0 M (comprimido) por tempo de estudo

Tempo de estudo	Tempo de retenção relativo (TRR) dos picos em relação à Lamivudina	Tempo de retenção relativo (TRR) dos picos em relação à Zidovudina	Área dos picos	Área de pico de 3TC	Área de pico de AZT	Teor de 3TC (%)	Teor de AZT (%)
Zero	[1] 0,377 [2] 0,625 [3] 1,325	[1] 0,100 [2] 0,165 [3] 0,351	40088 20835 75087	29083035	49480965	93,61	98,94
24 horas	[1] 0,395 [2] 0,642 [3] 1,314	[1] 0,102 [2] 0,165 [3] 0,338	310758 30946 620802	27046022	49741753	87,05	99,46
48 horas	[1] 0,383 [2] 0,524 [3] 1,322	[1] 0,101 [2] 0,142 [3] 0,356	606405 133821 1217179	25607479	50608372	82,42	100,62
72 horas	[1] 0,377 [2] 0,532 [3] 1,304	[1] 0,100 [2] 0,140 [3] 0,343	830980 188653 1768000	22919572	49733119	73,77	99,44
10 Dias	[1] 0,383 [2] 0,538 [3] 1,326	[1] 0,104 [2] 0,146 [3] 0,359	2622046 763218 4317263	12707606	48391737	40,90	96,76
15 Dias	[1] 0,388 [2] 0,544 [3] 1,339 [5] 0,433 -----	[1] 0,104 [2] 0,146 [3] 0,358 [5] 0,116 [6] 0,171	3347883 751452 5415511 182405 220303	7786177	48366749	25,06	96,71
30 Dias	[1] 0,407 [2] 0,564 [3] 1,357 [5] 0,455 -----	[1] 0,105 [2] 0,145 [3] 0,349 [5] 0,117 [6] 0,171	4151400 1159558 6048709 471923 426788	1398430	47469727	4,50	94,92

NAOH 5,0 M

OVERLAY DOS CROMATOGRAMAS E PERCENTUAL DOS ATIVOS: Foi verificado no tempo zero de estudo a presença dos picos de zidovudina e lamivudina com percentual de 95% e 84,8%, respectivamente. Neste tempo, surgiram três picos com [1] TRR 0,103 DEG B1 e área 1239417; [2] TRR 0,143 DEG B2 e área 749204; [3] TRR 0,359 DEG B3 e área 782769. Em 24 horas, frente ao padrão comparativo a zidovudina havia decaído 8,5%, enquanto a lamivudina 45%, ou seja, fora do limite aceitável. Não houve o surgimento de picos novos. Além disso, houve aumento de área dos picos de DEG B1 (3x), DEG B2 (7x) e DEG B3 (5x). Em 72 horas, a zidovudina atingiu um decaimento de 23% e a lamivudina de 87%. Não houve o surgimento de picos novos. Conforme no tempo anterior, houve aumento das áreas dos picos de DEG B1 (5x), DEG B2 (15x), DEG B3 (8x) em relação ao tempo inicial. Como em condições anteriores é possível inferir que os picos de DEG B1, B2, B3 representam produtos de degradação advindos da lamivudina. Portanto ambos fármacos são susceptíveis as condições de degradação.

ANÁLISE ESPECTRAL: Na análise de pureza de pico tem-se que em 24 horas a zidovudina e a lamivudina apresentaram pureza total, equivalente a 1,000000, como mostra o gráfico 18. Indicando assim, ausência de qualquer outro componente no mesmo pico. Para a análise de similaridade de picos verifica-se que as amostras de lamivudina e a zidovudina possuem picos similares ao padrão, com valor de similaridade 0,9991 e 1,0000.

Figura 18: Overlay dos cromatogramas na condição de degradação por hidrólise básica 5,0 M nos tempos zero (verde) e 24 horas (preto)

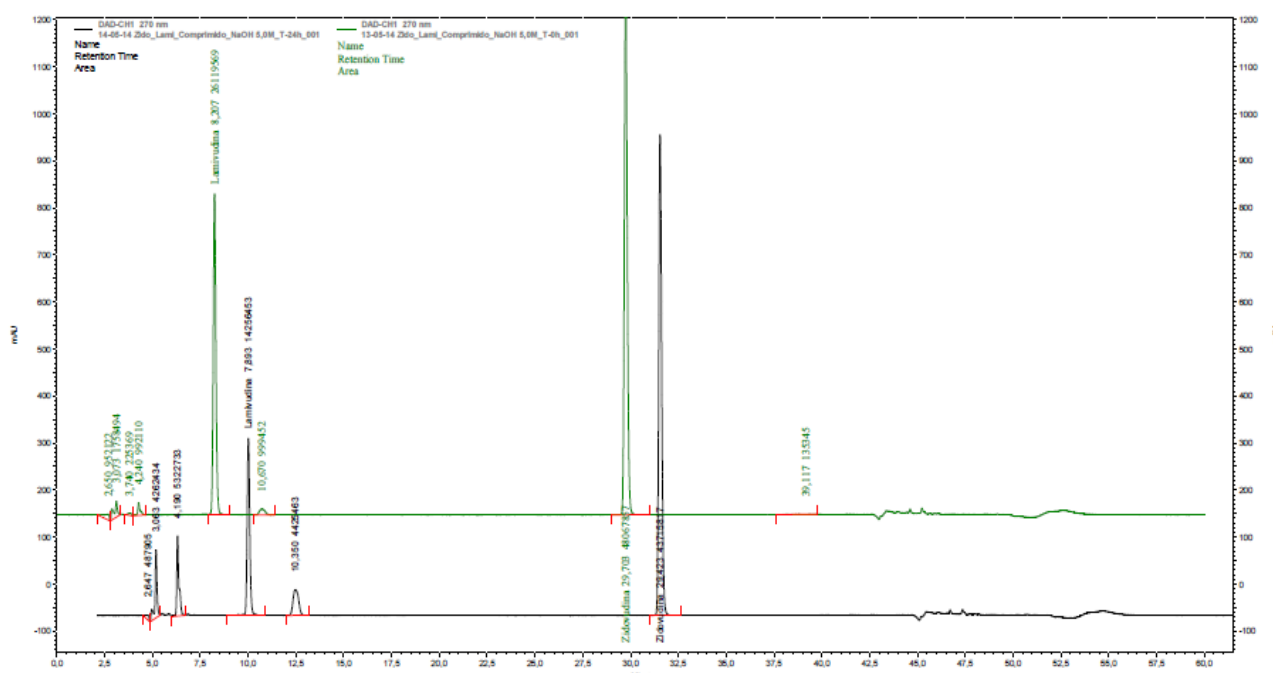
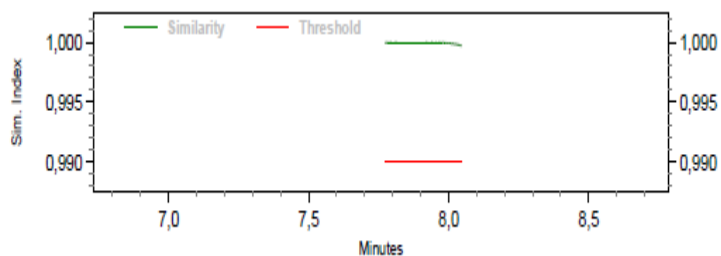


Gráfico 18: Gráficos de pureza e similaridade de picos de lamivudina e zidovudina no estudo de degradação básica 5,0 M no tempo de 24 horas (comprimido). Para a similaridade o padrão é representado em verde e a amostra em azul.

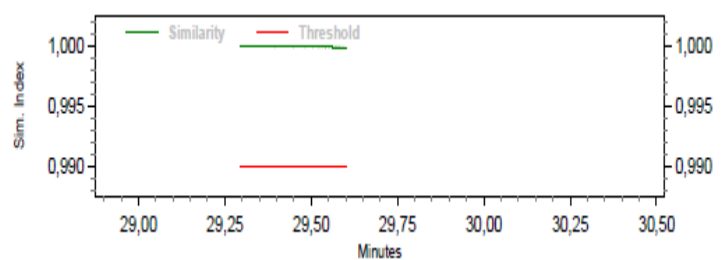
PUREZA DE PICOS – 24 HORAS



Tempo de retenção do pico: 7,89 m

Nome do pico: Lamivudina

Pureza total: 1,000000

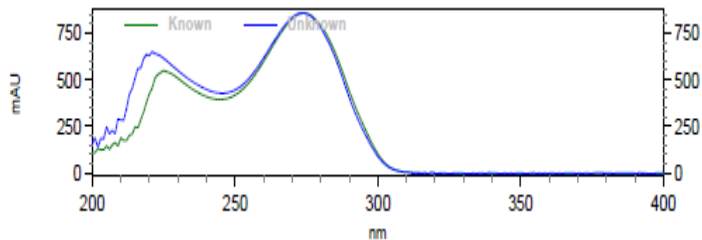


Tempo de retenção do pico: 29,42 m

Nome do pico: Zidovudina

Pureza total: 1,000000

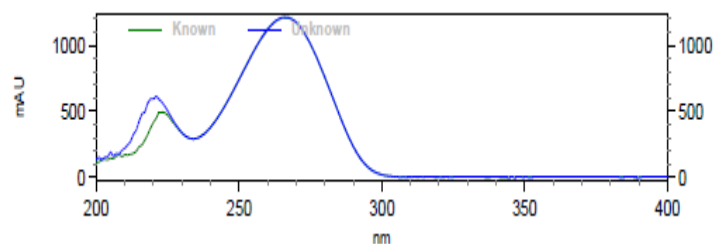
SIMILARIDADE DE PICOS – 24 HORAS



Tempo de retenção do pico: 7,56 m

Nome do pico: Lamivudina

Similaridade: 0,9991



Tempo de retenção do pico: 29,20 m

Nome do pico: Zidovudina

Similaridade: 1,0000

Tabela 25: Áreas e Tempo de Retenção Relativa (TRR) dos picos e teor de lamivudina e zidovudina nas amostras que sofreram hidrólise básica 5,0 M (comprimido) por tempo de estudo

Tempo de estudo	Tempo de retenção relativo (TRR) dos picos em relação à Lamivudina	Tempo de retenção relativo (TRR) dos picos em relação à Zidovudina	Área dos picos	Área de pico de 3TC	Área de pico de AZT	Teor de 3TC (%)	Teor de AZT (%)
Zero	[1] 0,374 [2] 0,517 [3] 1,301	[1] 0,103 [2] 0,143 [3] 0,359	1239417 749204 782769	26346147	47541552	84,80	95,06
24 horas	[1] 0,389 [2] 0,531 [3] 1,311	[1] 0,104 [2] 0,142 [3] 0,352	4167081 5150410 4295547	14456137	43468285	46,53	86,92
48 horas	[1] 0,380 [2] 0,519 [3] 1,300	[1] 0,104 [2] 0,142 [3] 0,356	5467312 8868648 6100632	6874997	39383650	22,13	78,75
72 horas	[1] 0,381 [2] 0,523 [3] 1,311	[1] 0,104 [2] 0,142 [3] 0,357	6243328 11256084 6778438	3474919	36540486	11,18	73,06

5.2.3 Oxidação

H₂O₂ 0,03%

COLORAÇÃO: Assim como, na matéria-prima em todos os tempos e concentrações de peróxido de hidrogênio (H₂O₂), as amostras em solução degradativa se mantiveram incolor.

OVERLAY DOS CROMATOGRAMAS E PERCENTUAL DOS ATIVOS: Foi verificado no tempo zero de estudo a presença dos picos de zidovudina e lamivudina com percentual de 95,8% e 98,8%, respectivamente. Neste tempo, foi verificada a presença de um pico com [1] TRR 0,134 DEG O1 e área 256645. Após 72 H, frente ao padrão comparativo, a zidovudina não apresentou decaimento e a lamivudina havia decaído aproximadamente 12%. O pico de DEG O1 teve aumento de área (14x), em relação ao tempo inicial, além disso, não surgiram picos novos. Em 30 dias, a zidovudina manteve o teor do início do estudo e a lamivudina apresentou um decaimento de 30%, portanto dentro do limite aceitável. O pico de DEG O1 teve aumento de área (42x) se comparado ao tempo zero e não surgiram picos novos. Conforme nas condições anteriores pode-se inferir que o pico de DEG O1 é um produto de degradação advindo da lamivudina. Portanto evidencia-se que apenas a lamivudina foi susceptível às condições oxidativas a 0,03% de peróxido de hidrogênio.

ANÁLISE ESPECTRAL: Na análise de pureza de pico tem-se que em 30 dias a zidovudina e a lamivudina apresentaram pureza total, equivalente a 1,000000, como mostra o gráfico 19. Indicando assim, ausência de qualquer outro componente no mesmo pico. Para a análise de similaridade de picos verifica-se que as amostras de lamivudina e a zidovudina possuem picos similares ao padrão, com valor de similaridade 0,9999 e 1,0000.

Figura 19: Overlay dos cromatogramas na condição de degradação por oxidação (H_2O_2 0,03%) nos tempos zero (verde) e 30 dias (preto)

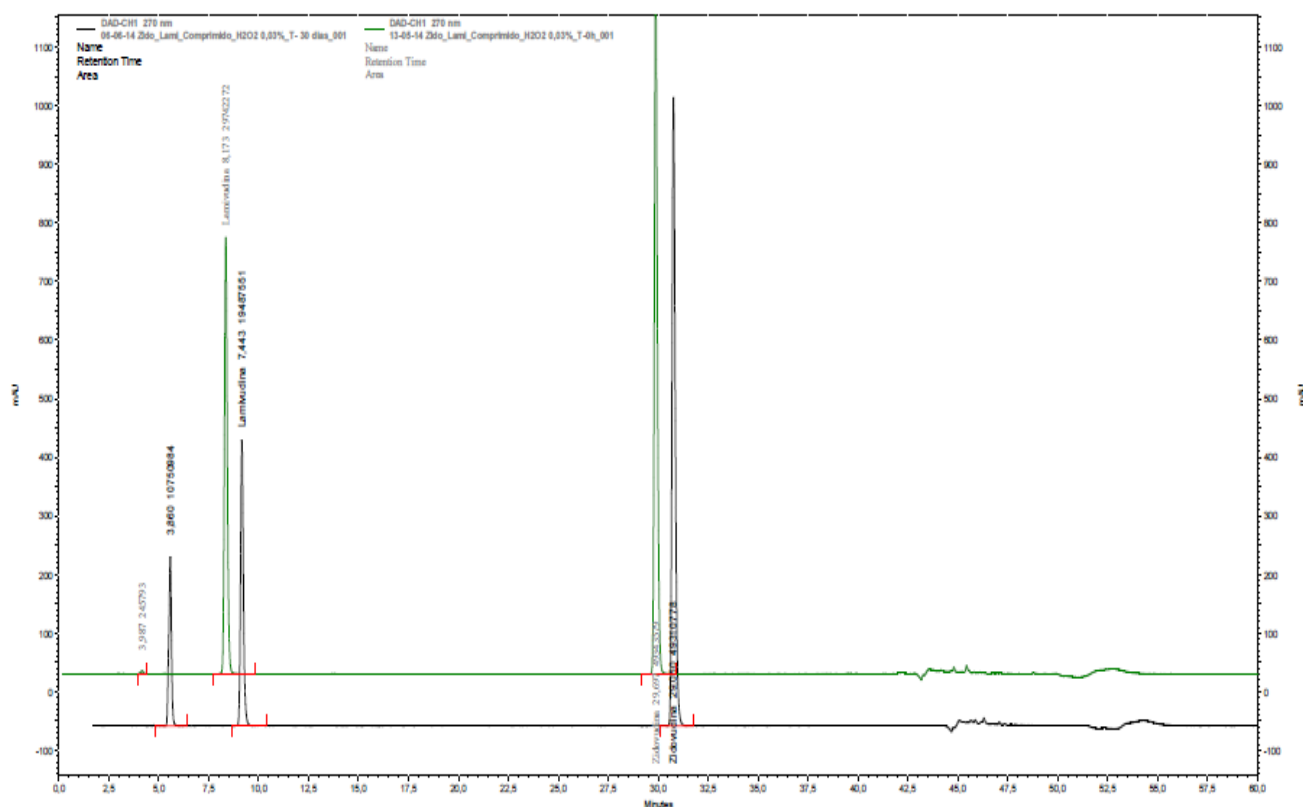
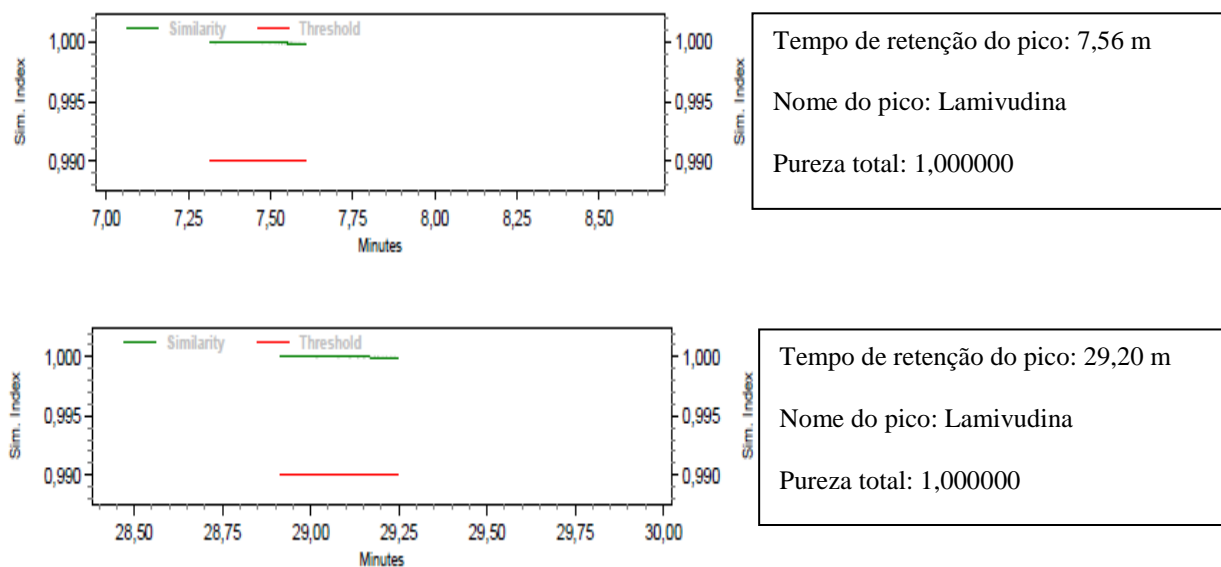
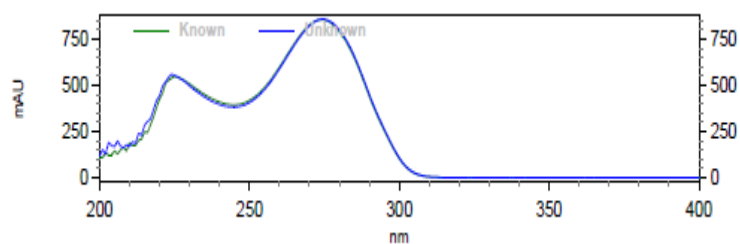


Gráfico 19: Gráficos de pureza e similaridade de picos de lamivudina e zidovudina no estudo de degradação oxidativa (H_2O_2 0,03%) no tempo de 30 dias (comprimido). Para a similaridade o padrão é representado em verde e a amostra em azul.

PUREZA DE PICOS – 30 DIAS



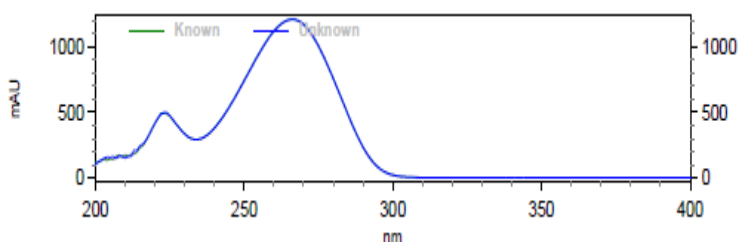
SIMILARIDADE DE PICOS – 30 DIAS



Tempo de retenção do pico: 7,44 m

Nome do pico: Lamivudina

Similaridade: 0,9999



Tempo de retenção do pico: 29,05 m

Nome do pico: Zidovudina

Similaridade: 1,0000

Tabela 26: Áreas e Tempo de Retenção Relativa (TRR) dos picos e teor de lamivudina e zidovudina presentes nas amostras que sofreram oxidação (H_2O_2 0,03%), comprimido por tempo de estudo

Tempo de estudo	Tempo de retenção relativo (TRR) dos picos em relação a Lamivudina	Tempo de retenção relativo (TRR) dos picos em relação à Zidovudina	Área dos picos	Área de pico de 3TC	Área de pico de AZT	Teor de 3TC (%)	Teor de AZT (%)
Zero	[1] 0,488	[1] 0,134	256645	29768001	49397373	95,81	98,77
24 Horas	[1] 0,500	[1] 0,134	1401689	28518068	48992330	91,79	97,96
48 Horas	[1] 0,492	[1] 0,134	2579822	27265508	49163193	87,76	98,3
72 Horas	[1] 0,495	[1] 0,134	3636076	26294068	49163193	84,63	98,06
7 Dias	[1] 0,504	[1] 0,134	6292451	23684502	49040917	76,23	98,11
15 Dias	[1] 0,507	[1] 0,134	10729545	19595072	49934965	63,07	99,85
30 Dias	[1] 0,519	[1] 0,134	10818840	10818840	49520409	66,26	99,02

H₂O₂ 0,3%

OVERLAY DOS CROMATOGRAMAS E PERCENTUAL DOS ATIVOS: Foi verificado no tempo zero do estudo a presença dos picos de zidovudina e lamivudina com percentual de 98,4% e 103,5%, respectivamente. Neste tempo foi registrado um pico com [1] TRR 0,134 e área 1465572. Em 24 horas, frente ao padrão comparativo a zidovudina não apresentou decaimento e a lamivudina apresentou um decaimento de 30%, portanto dentro do limite aceitável. Não surgiram picos novos e o pico de DEG O1 teve crescimento de área de (6x) em relação ao tempo inicial. O estudo prosseguiu até 30 dias, com a finalidade de verificar se haveria decaimento de zidovudina, o que não foi registrado, já a lamivudina foi praticamente completamente degradada. Não surgiram picos novos e o pico de DEG O1 teve um crescimento de área (13x) em relação ao tempo zero. Conforme nas condições anteriores, pode-se inferir que o referido pico de DEG O1 é um produto de degradação advindo da lamivudina. Portanto, assim como na condição anterior evidencia-se que apenas a lamivudina foi susceptível às condições oxidativas a 0,3% de peróxido de hidrogênio.

ANÁLISE ESPECTRAL: Na análise de pureza de pico tem-se que em 24 horas a zidovudina e a lamivudina apresentaram pureza total, equivalente a 1,000000, como mostra o gráfico 20. Indicando assim, ausência de qualquer outro componente no mesmo pico. Para a análise de similaridade de picos verifica-se que as amostras de lamivudina e a zidovudina possuem picos similares ao padrão, com valor de similaridade 0,9997 e 1,0000.

Figura 20: Overlay dos cromatogramas na condição de degradação por oxidação (H₂O₂ 0,3%) nos tempos zero (azul), 24 horas (preto) e o branco das amostras (verde)

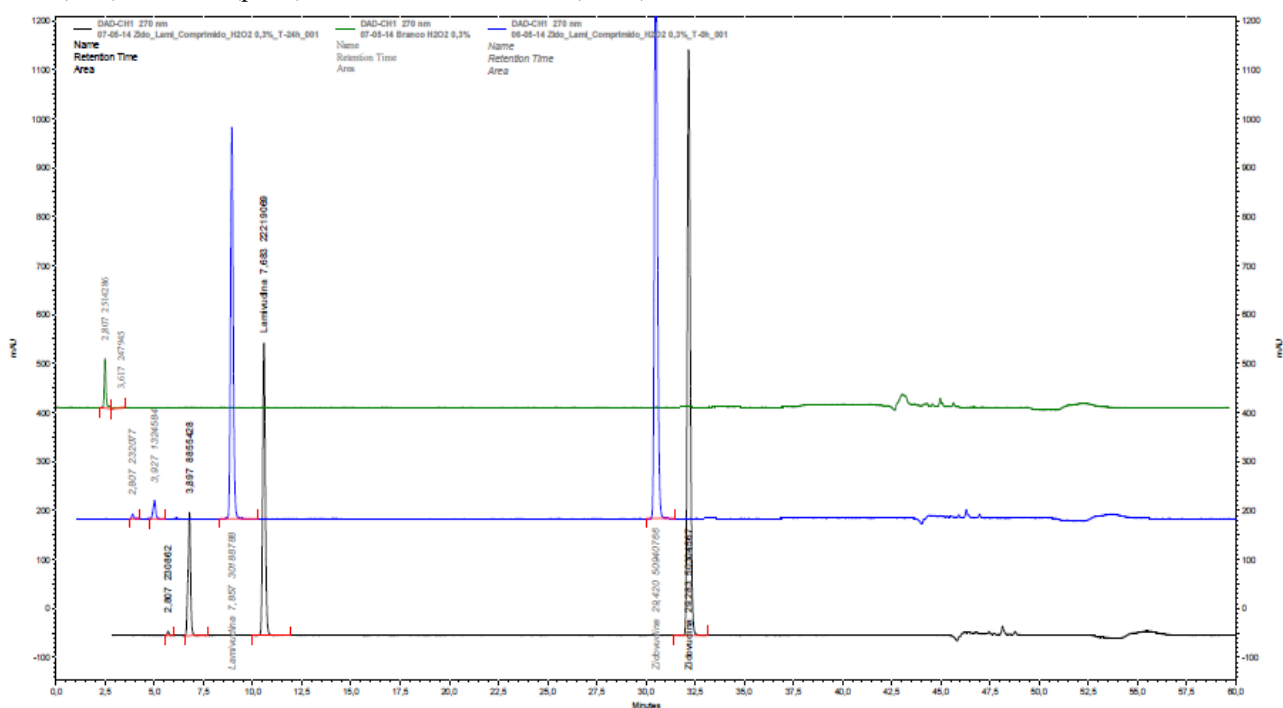
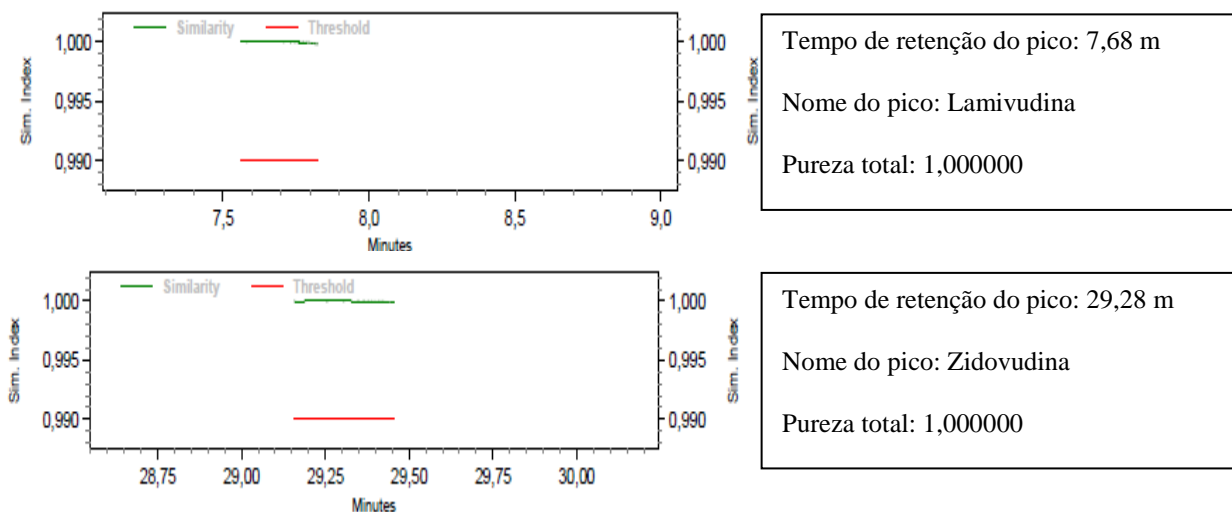


Gráfico 20: Gráficos de pureza e similaridade de picos de lamivudina e zidovudina no estudo de degradação oxidativa (H_2O_2 0,3%) no tempo de 24 horas (comprimido). Para a similaridade o padrão é representado em verde e a amostra em azul.

PUREZA DE PICOS – 24 HORAS



SIMILARIDADE DE PICOS – 24 HORAS

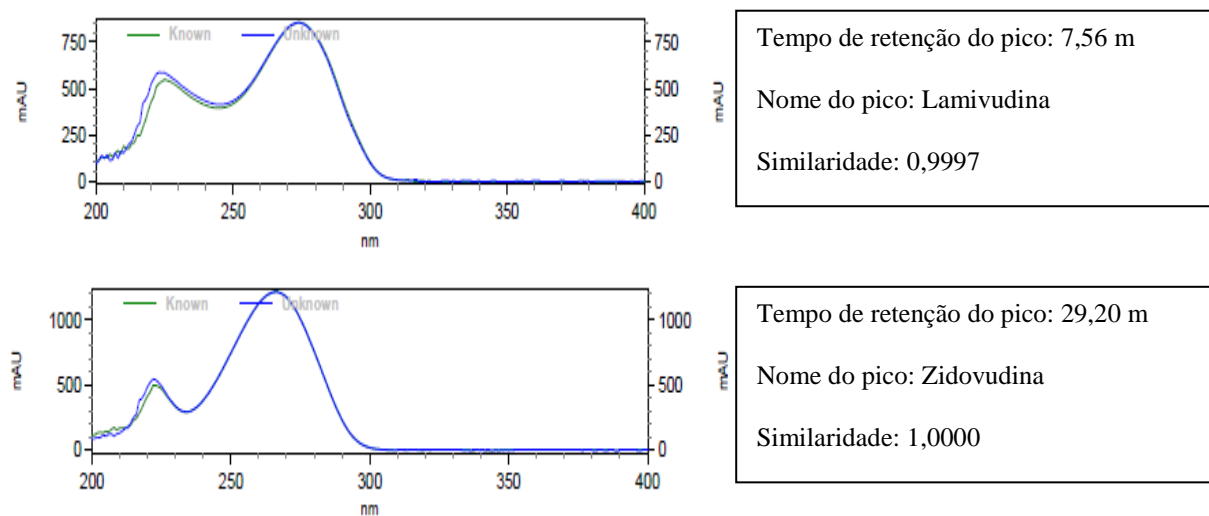


Tabela 27: Áreas e Tempo de Retenção Relativo (TRR) dos picos e teor de lamivudina e zidovudina presentes nas amostras que sofreram oxidação (H_2O_2 0,3%) comprimido, por tempo de estudo

Tempo de estudo	Tempo de retenção relativo (TRR) dos picos em relação à Lamivudina	Tempo de retenção relativo (TRR) dos picos em relação à Zidovudina	Área dos picos	Área de pico de 3TC	Área de pico de AZT	Teor de 3TC (%)	Teor de AZT (%)
Zero	[1] 0,500	[1] 0,133	1465572	30560082	51748175	98,36	103,47
24 Horas	[1] 0,507	[1] 0,133	9071227	21607980	49589225	69,55	99,16
48 Horas	[1] 0,485	[1] 0,135	15361448	15434240	51277423	49,68	102,53
72 Horas	[1] 0,486	[1] 0,135	19493337	10691966	50728149	34,41	101,43

H₂O₂ 3%

OVERLAY DOS CROMATOGRAMAS E PERCENTUAL DOS ATIVOS: Foi verificado no tempo zero do estudo a presença dos picos de zidovudina e lamivudina com percentual de 102,16% e 57,57%, respectivamente, ou seja, a lamivudina já havia decaído acima do limite aceitável. Ainda assim, o estudo prosseguiu com a finalidade de avaliar o decaimento de zidovudina. Neste tempo, surgiu um pico [1] com TRR 0,134 DEG O1 e área 13005054. Em 24 horas, a lamivudina já estava praticamente totalmente degradada e a zidovudina não apresentou decaimento. Não surgiram picos novos e o pico de DEG O1 teve aumento de área (2x) em relação ao tempo anterior. Em 72 horas, não foi registrado decaimento da zidovudina, já a lamivudina estava completamente degradada. Não surgiram picos novos e o pico de DEG O1 teve uma pequena queda de área em relação ao tempo anterior, que pode ser justificada pela formação de compostos de degradação secundários que não puderam ser identificados. Conforme nas condições anteriores pode-se inferir que o pico de DEG O1 é um produto de degradação advindo da lamivudina. Portanto evidencia-se que apenas a lamivudina foi susceptível às condições oxidativas a 3% de peróxido de hidrogênio.

ANÁLISE ESPECTRAL: Na análise de pureza de pico tem-se que em 24 horas a zidovudina e a lamivudina apresentaram pureza total, equivalente a 1,000000, como mostra o gráfico 21. Indicando assim, ausência de qualquer outro componente no mesmo pico. Para a análise de similaridade de picos verifica-se que a lamivudina apresentou um valor de 0,9931 se comparado ao padrão, e que o decaimento na linha azul representativa do ativo poderá indicar baixa concentração do fármaco, já no tempo zero ou a presença de possíveis produtos de degradação, já a zidovudina registrou valor de similaridade 1,0000.

Figura 21: Overlay dos cromatogramas na condição de degradação por oxidação (H₂O₂ 3%) nos tempos zero (verde), 24 horas (preto) e o branco das amostras (azul)

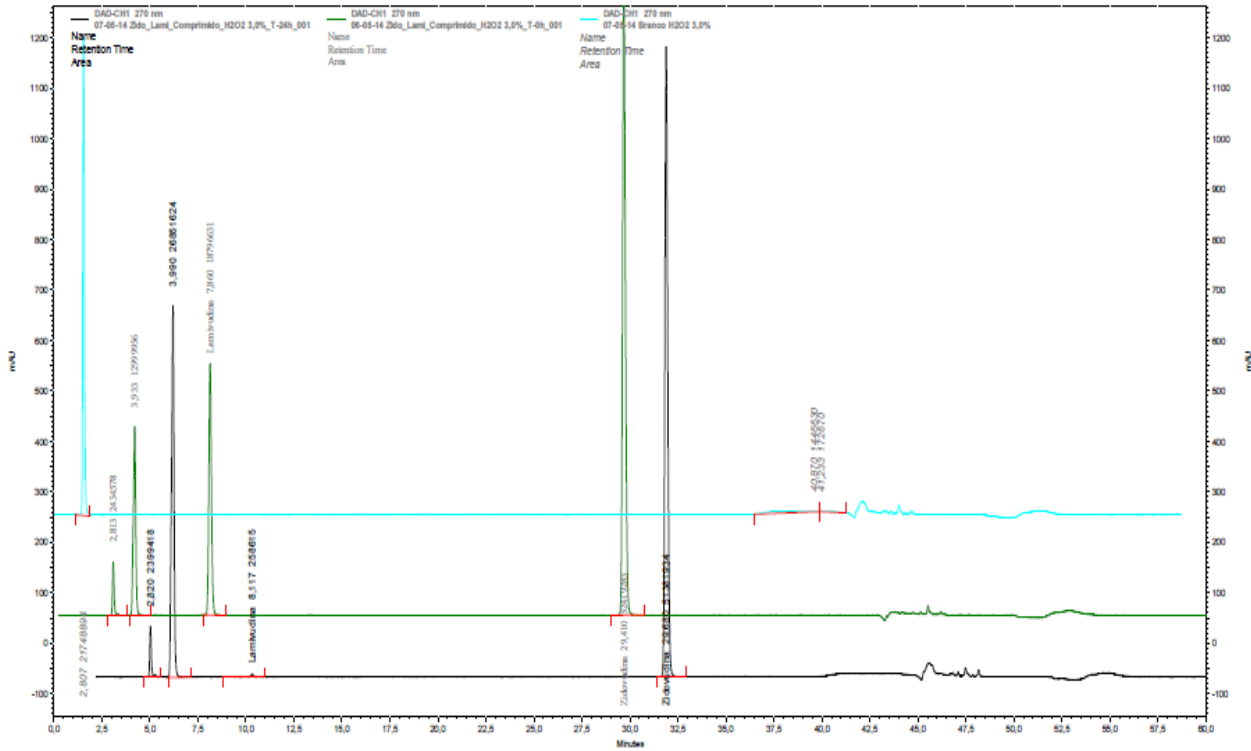
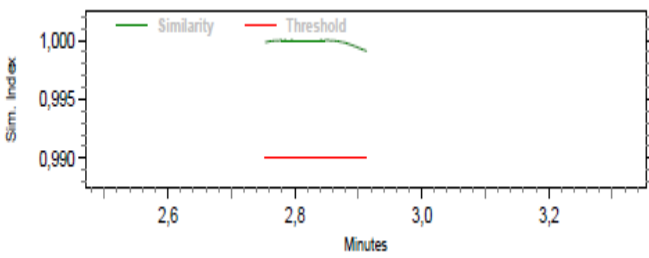
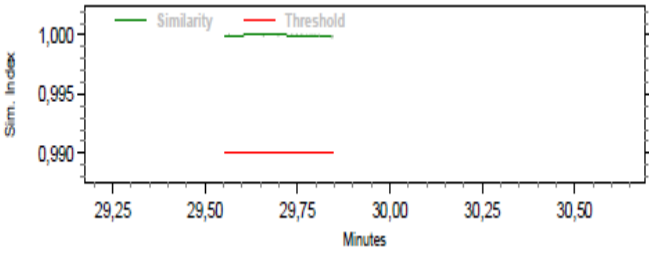


Gráfico 21: Gráficos de pureza e similaridade de picos de lamivudina e zidovudina no estudo de degradação oxidativa (H₂O₂ 3%) no tempo de 24 horas (comprimido). Para a similaridade o padrão é representado em verde e a amostra em azul.

PUREZA DE PICOS – 24 HORAS

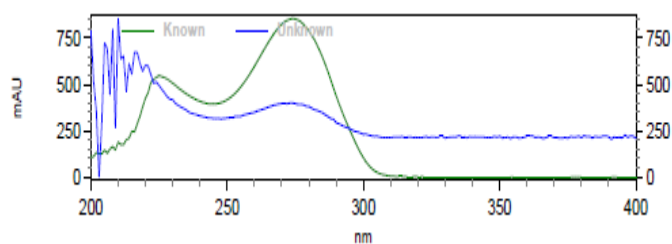


Tempo de retenção do pico: 2,82 m
Nome do pico: Lamivudina
Pureza total: 1,000000



Tempo de retenção do pico: 29,68 m
Nome do pico: Zidovudina
Pureza total: 1,000000

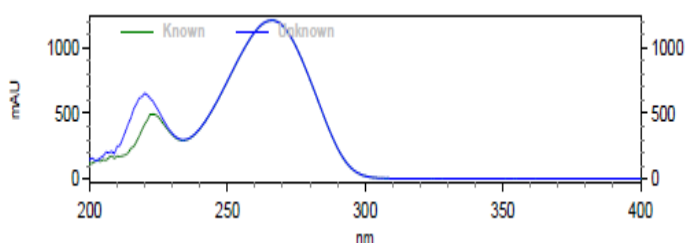
SIMILARIDADE DE PICOS – 24 HORAS



Tempo de retenção do pico: 7,56 m

Nome do pico: Lamivudina

Similaridade: 0,9931



Tempo de retenção do pico: 29,20 m

Nome do pico: Zidovudina

Similaridade: 1,0000

Tabela 28: Áreas e Tempo de Retenção Relativa (TRR) dos picos e teor de lamivudina e zidovudina presentes nas amostras que sofreram oxidação (H_2O_2 3%) comprimido por tempo de estudo

Tempo de estudo	Tempo de retenção relativo (TRR) dos picos em relação a Lamivudina	Tempo de retenção relativo (TRR) dos picos em relação à Zidovudina	Área dos picos	Área de pico de 3TC	Área de pico de AZT	Teor de 3TC (%)	Teor de AZT (%)
Zero	[1] 0,500	[1] 0,134	13005054	17886433	51092813	57,57	102,16
24 Horas	[1] 0,491	[1] 0,134	27354100	289721	52387275	0,93	104,75
48 Horas	[1] 0,486	[1] 0,135	23277176	0	51317954	0	102,61
72 Horas	[1] 0,485	[1] 0,135	20864442	0	51119027	0	100,22

5.2.4 Neutra

COLORAÇÃO: As amostras em solução degradativa mantiveram-se incolores.

OVERLAY E PERCENTUAL DOS ATIVOS: Foi verificado no tempo zero do estudo a presença dos picos de zidovudina e lamivudina com percentual de 103,8% e 103,4%, respectivamente. Não foram observados picos de degradação. Ao decorrer 30 dias de estudo não houve decaimento dos ativos, além disso não houve o surgimento de picos de degradação, o que denota que ambos fármacos não são susceptíveis a esta condição de estresse.

ANÁLISE ESPECTRAL: Na análise de pureza de pico tem-se que em 24 horas a zidovudina e a lamivudina apresentaram pureza total, equivalente a 1,000000, como mostra o gráfico 22. Indicando assim, ausência de qualquer outro componente no mesmo pico. Para a análise de similaridade de picos verifica-se que as amostras de lamivudina e a zidovudina possuem picos similares ao padrão, com valor de similaridade 0,9999 e 1,0000.

Figura 22: Overlay dos cromatogramas na condição de degradação neutra nos tempos zero (verde) e 30 dias (preto)

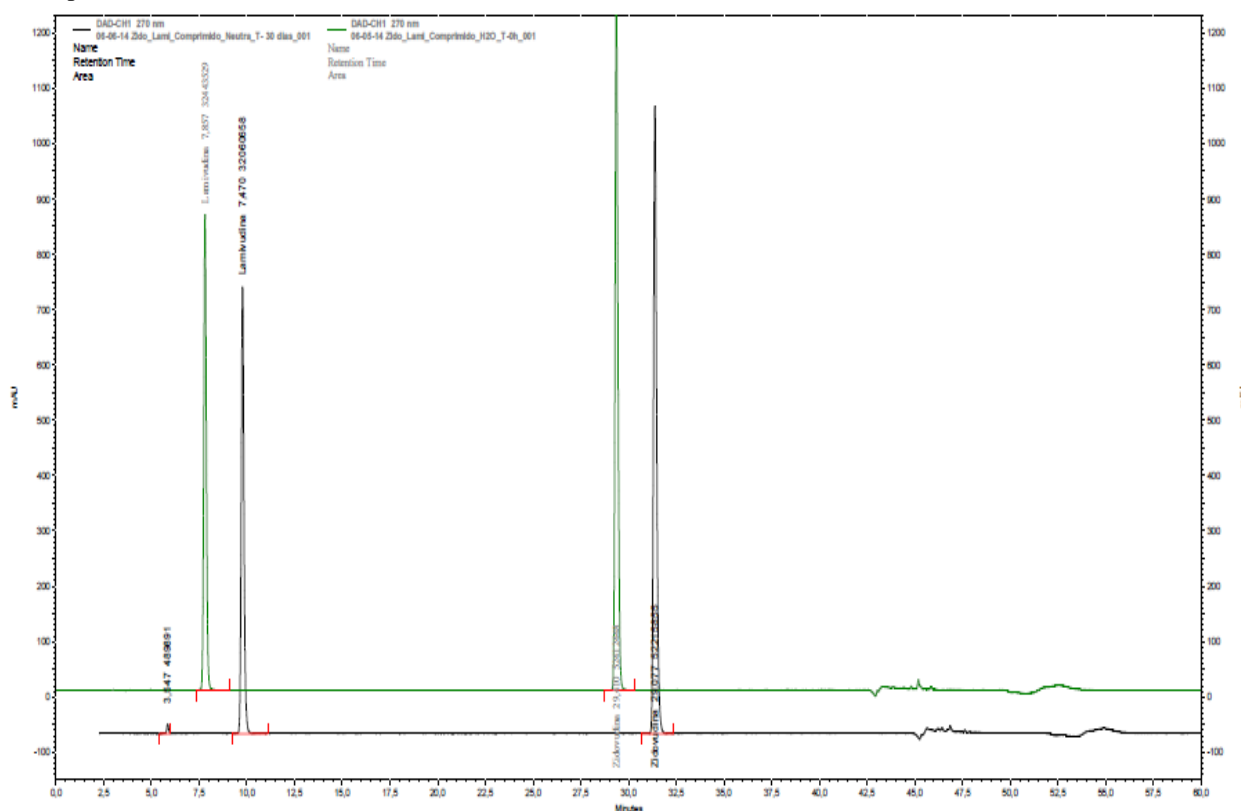
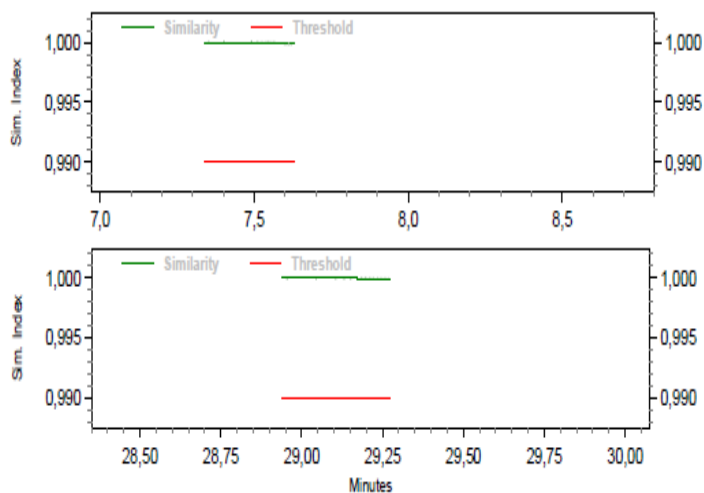


Gráfico 22: Gráficos de pureza e similaridade de picos de lamivudina e zidovudina no estudo de degradação neutra (H₂O) no tempo de 30 dias (comprimido). Para a similaridade o padrão é representado em verde e a amostra em azul.

PUREZA DE PICOS – 30 DIAS



Tempo de retenção do pico: 7,47 m

Nome do pico: Lamivudina

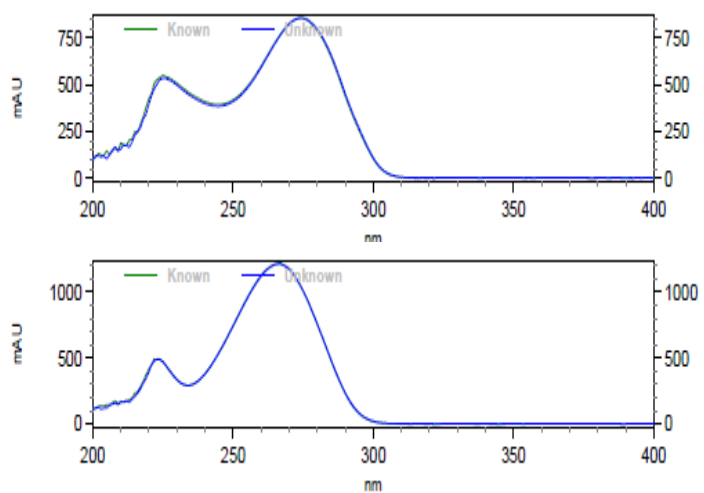
Pureza total: 1,0000

Tempo de retenção do pico: 29,08 m

Nome do pico: Lamivudina

Pureza total: 1,0000

SIMILARIDADE DE PICO – 30 DIAS



Tempo de retenção do pico: 7,56 m

Nome do pico: Lamivudina

Similaridade: 0,9999

Tempo de retenção do pico: 29,20 m

Nome do pico: Zidovudina

Similaridade: 1,0000

Tabela 29: Áreas e Tempo de retenção relativa (TRR) dos picos e teor de lamivudina e zidovudina presentes nas amostras que sofreram hidrólise neutra (comprimido) por tempo de estudo

Tempo de estudo	Área de pico de Lamivudina	Área de pico de Zidovudina	Teor de Lamivudina (%)	Teor de Zidovudina (%)
Zero	32118709	51897393	103,38	103,77
24 Horas	31665355	51503750	101,92	102,98
48 Horas	31529198	51577581	101,48	103,13
72 Horas	31745512	51728999	102,18	103,44
7 Dias	30812222	50090005	99,17	100,16
15 Dias	31124927	50349280	100,18	100,68
30 Dias	31783745	51426041	102,30	102,83

6. CONCLUSÃO

Conforme os resultados dos testes de estresse por hidrólise (básica, ácida e neutra) e oxidação, constata-se que o método baseado na metodologia da USP 36 consegue detectar produtos de degradação da lamivudina e da zidovudina, além de demonstrar especificidade e seletividade a partir da análise de pureza e similaridade de pico.

A inferência à respeito da origem dos produtos de degradação foi possível através do uso de padrões conhecidos obtidos em estudos anteriores, para comparação com os picos de degradação visualizados nos diferentes cromatogramas.

Em relação à matéria-prima, a zidovudina mostrou-se estável nas condições básica (0,1 e 1,0 M) e ácida (0,1 e 1,0 M) em 30 dias, já em condições básica e ácida (5,0 M), apresentou degradação de 46,60% e 31,65%, respectivamente em 7 dias. E nos testes de oxidação com peróxido de hidrogênio (H_2O_2) 0,03%, 0,3% e 3%, em 7 dias houve degradação de 16,7%, 24,3% e 45,9%, respectivamente. A lamivudina mostrou-se estável em meio ácido (0,1 e 1,0 M) 30 dias, já na condição ácida (5,0 M) apresentou 25,1% de degradação em 7 dias. Em meio alcalino (0,1, 1,0 M) houve a degradação de 42,6% e 98,6%, respectivamente em 30 dias e na condição básica (5,0 M) a degradação foi de 99,3% em 7 dias. Nos testes de oxidação com peróxido de hidrogênio (H_2O_2) 0,03%, 0,3% e 3%, em 7 dias houve degradação de 32,3%, 91,3% e 100%, respectivamente.

Em relação ao comprimido, a zidovudina mostrou-se estável nas condições básica (0,1 e 1,0 M) e ácida (0,1 e 1,0 M) em 30 dias, assim como na matéria-prima, já em condição básica e ácida (5,0 M), apresentou degradação de 23,14% em 72 horas e 59,70% em 30 dias, respectivamente. Nos testes de oxidação com peróxido de hidrogênio (H_2O_2) 0,03%, 0,3% e 3% permaneceu estável, após 72 horas, assim como na hidrólise neutra em 30 dias. A lamivudina mostrou-se estável em meio ácido (0,1 e 1,0 M) 30 dias, já na condição ácida (5,0 M) apresentou 43,2% de degradação em 30 dias. Em meio alcalino (0,1M) apresentou-se estável, já em básico (1,0 e 5,0 M), houve degradação de 95,2% em 30 dias e 86,8% em 72 horas, respectivamente. Nos testes de oxidação com peróxido de hidrogênio (H_2O_2) 0,03%, 0,3% e 3% houve degradação de 30,8% em 30 dias, 65% em 72 horas e 99,9% em 24 horas, respectivamente.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, C. H.; FREITAS, L. M. D.; OLIVEIRA, V. D. Twenty-six years of HIV science: an overview of anti-HIV drugs metabolism. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, p. 209-230, 2011.
- AOKI, F. Y. Infecções virais. In: PAGE, C. P.; CURTIS, M.J.; SUTTER, M. C.; WALKER, M. J. A.; HOFFMAN, B. B. **Farmacologia Integrada**. São Paulo: Manole, 1999, p. 445-460.
- ARTHOS, J., et al. HIV-1 envelope protein binds to and signals through integrin alpha (4) beta (7), the gut mucosal homing receptor for peripheral T cells. **Nature Immunology In Press**, v.3, p. 301-309, 2008.
- BECK, R. C. R., et al. HIV/AIDS treatment and physicochemical quality control of medicines: evaluation of non-generic lamivudine + zidovudine tablets manufactured in Brazil. **Braz J Infect Dis [online]**, Salvador, v.11, n.8, p.540-543, dez.2007.
- BRASIL. Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Diário Oficial da União**. Poder executivo, Brasília, DF, 02 jun. 2003. Disponível em: <<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=15132&word>>. Acesso em: 01 jul. 2014.
- BRASIL. Resolução nº 01, de 29 de julho de 2005. Guia para a realização de estudos de estabilidade. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Diário Oficial da União**. Poder Executivo, Brasília, DF. 01 ago. 2005. Disponível em: <<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=18109&word>>. Acesso em: 05 maio 2014.
- BRASIL. Informe Técnico nº 01, de 15 de julho de 2008 - Esclarecimento sobre o item 2.9 do anexo da Resolução RE nº1 de 29/07/2005, que trata do Guia para realização dos estudos de estabilidade. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Diário Oficial da União**. Poder Executivo, Brasília, DF, 15 jul. 2008. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/informes/2008/index.htm>>. Acesso em: 23 maio 2014.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Farmacopéia Brasileira**, 5ª ed, vol 2, Brasília, DF, 2010. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/hotsite/cd_farmacopeia/index.htm> Acesso em: 01 jul. 2014.
- BRASIL, Ministério da Saúde. **Boletim epidemiológico AIDS e DST**. Brasília, DF, 2013a
- BRASIL. Resolução nº 58, de 20 de dezembro de 2013. Estabelece parâmetros para a notificação, identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos com substâncias ativas sintéticas e semissintéticas, classificados como novos, genéricos e similares, e dá outras providências. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Diário Oficial da União**. Poder Executivo, Brasília, DF, 23 dez. 2013b. Disponível em: <<http://sintse.tse.jus.br/documentos/2013/Dez/23/resolucao-no-58-de-20-de-dezembro-de-2013>> Acesso em: 25 maio 2014.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **HIV Testing Trends in the United States, 2000-2011**. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention. Disponível em: <http://www.cdc.gov/hiv/pdf/testing_trends.pdf>. Acesso em: 20 jun. 2014.

CHAN, D.; KIM, P. HIV entry and its inhibition. **Cell**, v.93, n.5, p.681–684, 1998.

CHAN, D. C. et al. Core structure of gp 41 from the HIV envelope glycoprotein. **Cell**, v. 89, n. 2, p. 263-273, 1997

EMPRESA BRASIL DE COMUNICAÇÃO. **Produção nacional de antirretroviral para tratamento do HIV/AIDS começará em 2015.** <http://memoria.ebc.com.br/agenciabrasil/noticia/2012-11-30/producao-nacional-de-antirretroviral-para-tratamento-do-hiv-aids-comecara-em-2015>> Acesso em: 05 Ago. 2014.

ERON, J. J, et al. Efficacy, safety and adherence with a twice-daily combination lamivudine/zidovudine tablet formulation, plus a protease inhibitor, in HIV infection. **AIDS**, v. 14, n. 6, p. 671-681, 2000.

FARMANGUINHOS. **Instituto de tecnologia em Fármacos.** Disponível em: <<http://www.far.fiocruz.br>>. Acesso em 05 de agosto de 2014.

FERNANDES, C. **Estudo de equivalência farmacêutica de comprimidos de lamivudina 150 mg.** 2001. (Dissertação de Mestrado. Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais), p.189, Belo Horizonte.

GELDERBLOM, H. R. HIV sequence compendium. **Los Alamos National Laboratory**, p. 31-44, 1997.

GILBERT, P.B. et al. Comparison of HIV-1 and HIV-2 infectivity from a prospective cohort study in Senegal. **Statistics in Medicine**, v. 22, p. 573–593, 2003

HALLAL, R., et al. O acesso universal ao tratamento antirretroviral no Brasil. **Tempus Actas de Saúde Coletiva**, v. 4, n. 2, p. 53-66, 2010. Disponível em: <<http://www.tempusactas.unb.br/index.php/tempus/article/view/791/778>>. Acesso em: 23 Jul. 2014.

HALLENBERGER, S., et al. "Inhibition of furin-mediated cleavage activation of HIV-1 glycoprotein gp 160". **Nature**, v.360, n.6402, p.358–361, 2002.

HAVLIR, D. V.; LANGE, J. M. A. New antivirals and new combinations. **AIDS**, v.12, p.165-174, 1998.

HIV.<<http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/COMPENDIUM/2008compendium.html>>. Acesso em: 29 jul.2014.

INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES. National Institutes of Health, 2002. Disponível em: <<http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>>. Acesso em: 29 jul. 2014.

JOHNSON, M. A. et al. Clinical pharmacokinetics of lamivudine. **Clin. Pharmacokinet.**, v. 36, n. 1, p. 41-66, 1999.

JOZWIAKOWSKI, M. J.; NGUYEN, N. A. T.; SISCO, J.M.; SPANCAKE, C. W. Solubility behavior of lamivudine crystal forms in recrystallization solvents. **J.Pharm. Sci.**, Washington, v.85, n.2, p.193-199, 1996.

KYOKO, H.; ETSUKO, U.; MASUMITSU, T. Physicochemical properties and stability of Epivir tablets. *Kagaku Ryoho no Ryoiki*, Osaka, v.13, p. 1170-1172, 1997.

LAFEPE. Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco Governador Miguel Arraes. Disponível em: <http://www.lafepe.pe.gov.br/LAFEPE>>. Acesso em: 05 Ago. 2014.

MESPLET, N., et al. Simultaneous quantification of nucleoside HIV-1 reverse transcriptase inhibitors by short-end injection capillary electrochromatography on a β -cyclodextrinblonded silica stationary phase. **J. Chromatogr. A.**, v. 927, p. 161-168, 2001.

MONTANER J.S. Treatment as prevention: toward an AIDS-free generation. **Top Antivir Med.**, p.110-114, 2013.

MOYER, T.P. et al. Drug monitoring of antiretroviral therapy for HIV-1 infection: method validation and results of a pilot study. **Clin. Chem.**, v. 45, n. 9, p. 1465-1476, 1999.

NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH. **Crystal structure of key HIV protein reveals new prevention, treatment targets, 1998.** Disponível em: <<http://www.niaid.nih.gov/news/newsreleases/1998/Pages/hivprotein.Aspx>>. Acesso em: 29 jul.2014.

PASCOM, A. R. P. et al. Conhecimento e práticas sexuais de risco associados ao HIV na população brasileira de 15 a 64 anos, 2008. **Tempus Actas de Saúde Coletiva**, v. 4, n. 2, p. 101-112, 2010.

PERRY, C. M.; FAULDS, D. Lamivudine. A review of its antiviral activity, pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy in the management of HIV infection. **Drugs**, v.53, n.4, p. 657-680, 1997.

POLLARD, V.W.; MALIM, MH. The HIV-1 Rev protein. **Annu. Rev. Microbiol.**, v.52, p.491-532, 1998

POPE, M.; HAASE, A. Transmission, acute HIV-1 infection and the quest for strategies to prevent infection. **Nat Med.**, v.9, n.7, p. 847-852, 2003.

REEVES, J.D.; DOMS R.W . Human Immunodeficiency Virus Type 2. **Journal of General Virology**, p.1253-65, 2002.

RIDDHIBEN, M.P. et al. Stability Indicating HPLC Method Development- A Review. **International Research Journal of Pharmacy**, p. 79 – 87, 2011.

SINGH, S. et al. Review. Forced degradation studies to assess the stability of drugs and products. **Trends in Analytical chemistry** , v. 49, p. 71-88, 2013

SMITH, J.A.; DANIEL, R. Following the path of the virus: the exploitation of host DNA repair mechanisms by retroviruses. **ACS Chem Biol.**, p.217-26, 2006.

STYRT, B. A.; PIAZZA-HEPP, T. D.; CHIKAMI, G. K. Clinical toxicity of antiretroviral nucleoside analogs. **Antiv. Res.**, v.31, p. 121-135, 1996.

VEAL, G. J.; BACK, J. D. Metabolism of zidovudine. **Gen. Pharmacol.**, v. 26, n. 7, p. 1469-1475, 1995.

WYATT, R.; SODROSKI, J. The HIV-1 envelope glycoproteins: fusogens, antigens, and immunogens. **Science**, v. 280, p.1884-1888, 1998.

ZHENG, Y. H.; LOVSIN, N.; PETERLIN, B. M. Newly identified host factors modulate HIV replication". **Immunol. Lett.**, v.97, n.2, p. 225-234, 2005.

ZHOU, X. L.; SOMMADOSSI, J. P. Rapid quantitation of (-)-2'-deoxy-3'-thiacytidine in human serum by high performance liquid chromatography with ultraviolet detection. **J. Chromatogr. B.**, v. 691, p. 417-424, 1997.